

Aus dem Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung
der Philipps-Universität Marburg
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. R. Müller



Untersuchungen zur biologischen Funktion des transkriptionellen Repressors E2F6

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Humanbiologie
(Dr. rer. physiol.)

dem Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt

von

Jörg Storre

aus Oldenburg

Marburg 2004

Aus dem Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung
der Philipps-Universität Marburg
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. R. Müller



Untersuchungen zur biologischen Funktion des transkriptionellen Repressors E2F6

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Humanbiologie
(Dr. rer. physiol.)

dem Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt

von

Jörg Storre
aus Oldenburg

Marburg 2004

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg
am 15. Juni 2005.

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. B. Maisch
Referent: Prof. Dr. M. Eilers
Korreferent: Prof. Dr. T. Gudermann
2. Korreferent: PD Dr. A. Brehm

1	<i>Einleitung</i>	<i>1</i>
	1.1 pRb und E2F: Schaltstellen im Zellzyklus	1
	1.2 Die Proteinfamilie der E2F Transkriptionsfaktoren	2
	1.3 Die Pocket Protein regulierten E2F Proteine	4
	1.3.1 Spezifität der Pocket Protein Interaktion von E2F1-E2F5	4
	1.3.2 Mechanismus der Pocket Protein vermittelten Repression	4
	1.3.3 Funktion der Pocket Protein regulierten E2F Proteine im Zellzyklus	7
	1.3.4 Die Funktion der Pocket Protein regulierten E2F Proteine in der Entwicklung	9
	1.4 Die Pocket Protein unabhängigen E2F Proteine	10
	1.4.1 E2F7	10
	1.4.2 E2F6	11
	1.4.2.1 E2F6 und Polycomb Proteine	11
	1.4.2.2 E2F6 und das Mga/Max Heterodimer	13
	1.4.2.3 E2F6 und Histonmethyltransferasen	14
	1.4.2.4 E2F6 regulierte Gene in humanen Tumorzellen	14
	1.4.2.5 Der E2F6 vermittelte Repressionsmechanismus	15
	1.5 Zielsetzung der Arbeit	16
2	<i>Material</i>	<i>18</i>
	2.1 Mauslinien, Bakterienstämme und Zelllinien	18
	2.1.1 Mäuse	18
	2.1.1.1 Mus Musculus, die europäische Hausmaus	18
	2.1.1.2 Verwendete Inzucht-Mausstämme	18
	2.1.2 Bakterienstämme	19
	2.1.3 Säugerzellen	19
	2.2 Medien	20
	2.2.1 Medien für die Bakterienkultur	20
	2.2.2 Medien für die Zellkultur	20
	2.3 Oligonukleotide	21
	2.4 Plasmide	22
	2.5 Antikörper	24
	2.5.1 Antikörper für immunologische Nachweisverfahren	24

	2.5.2 Antikörper für Chromatinimmunpräzipitationen_____	24
2.6	Chemikalien_____	25
2.7	Lösungen_____	25
2.7.1	allgemeine Puffer und Lösungen_____	25
2.7.2	Spezielle Lösungen_____	30
2.7.2.1	Lösungen für die Histologie und Knochenfärbungen_____	30
2.7.2.2	Lösungen für in-situ Hybridisierungen_____	31
2.7.2.3	Lösungen für Luziferase Reporterassays_____	32
2.7.2.4	Lösungen für Chromatinimmunpräzipitationen_____	33
2.7.2.5	Lösungen zur präparativen Aufreinigung von His-mE2F6_____	34
2.7.2.6	Lösungen für die Zellkultur_____	34
2.7.3	Standards und Enzyme_____	35
2.7.3.1	Standards_____	35
2.7.3.2	sequenzspezifische Restriktionsendonukleasen_____	36
2.7.3.3	Protein-verdauende Enzyme_____	36
2.7.3.4	RNA und DNA verdauende Enzyme_____	36
2.7.3.5	Polymerasen und Reverse Transkriptasen_____	36
2.8	KITs_____	37
2.9	Geräte + Materialien_____	37
3	Methoden_____	39
3.1	Haltung, Zucht und Arbeit mit Mäusen_____	39
3.1.1	Der Umgang mit Mäusen_____	39
3.1.2	Zucht_____	39
3.1.3	Röntgenaufnahmen von Mäusen_____	39
3.1.4	Präparation von 9.5 Tage alten Embryonen_____	40
3.2	Zellbiologische Methoden_____	40
3.2.1	Präparation von Maus Embryonalen Fibroblasten_____	40
3.2.2	Passagieren von Zellen_____	41
3.2.3	Passage von Zellen nach dem 3T3 Protokoll_____	41
3.2.4	Synchronisierung von Zellen_____	42
3.2.5	Einfrieren und Auftauen von Zellen_____	42
3.2.6	Bestimmung der Zellzahl_____	42
3.2.7	Wachstumskurven von Maus embryonalen Fibroblasten_____	43

3.2.8	Durchflußzytometrische Bestimmung der Zellzyklusverteilung	43
3.2.9	Kinetik zum Wiedereintritt in den Zellzyklus	44
3.2.10	Koloniebildungsassay	45
3.2.11	Behandlung von Zellen mit TSA und 5'Aza	45
3.3	Transfektionen und Infektionen eukaryotischer Zellen	45
3.3.1	Transiente Lipofectamin Transfektion von Plasmid DNA	45
3.3.2	Transfektion durch Kalziumphosphatpräzipitation	46
3.3.3	Infektionen	46
3.4	Histologische Methoden	47
3.4.1	Präparation von adulten Organen und Paraffineinbettung	47
3.4.2	Hämatoxylin-Eosin Färbung (H.E. Färbung)	48
3.4.3	Knorpel und Knochenfärbung von Mausembryonen	48
3.5	Molekularbiologische Methoden	49
3.5.1	Arbeiten mit DNA	49
3.5.1.1	Standardverfahren der Molekularbiologie	49
3.5.1.2	Isolierung und Aufreinigung von DNA aus Mausschwanz- und Embryonalgewebe	49
3.5.1.3	Photometrische Bestimmung von Nukleinsäuren	50
3.5.1.4	PCR	50
3.5.1.5	Genotypisierung von Mäusen und Embryonen	51
3.5.2	Arbeiten mit RNA	52
3.5.2.1	Isolierung von RNA mit dem RNAeasy™ Kit	52
3.5.2.2	Isolierung von RNA mit TRIZOL™ Reagenz	52
3.5.2.3	Isolierung von RNA aus Mausgeweben	53
3.5.2.4	DNase Behandlung von RNA Proben	53
3.5.2.5	Phenol/Chloroform Extraktion und Fällung von RNA	53
3.5.2.6	Trennung von RNA in denaturierenden Formaldehydgelen	54
3.6	Expressionsanalysen	54
3.6.1	Semiquantitative Expressionsanalyse mit RT-PCR	54
3.6.1.1	Reverse Transkription von RNA und cDNA Synthese	54
3.6.1.2	Spezifische Amplifizierung von cDNA	55
3.6.2	Expressionsanalyse mit in-situ Hybridisierungen	56
3.6.2.1	Präparation von Digoxigenin markierten RNA Sonden	56
3.6.2.2	In-situ Hybridisierung an ganzen Embryonen	57

	3.6.3 Expressionsanalysen mit einem cDNA Microarray_____	59
3.7	Biochemische Arbeitsmethoden_____	62
3.7.1	Luziferase Reporteranalysen_____	62
3.7.1.1	Luziferase Reporteranalyse in transient transfizierten Fibroblasten_____	62
3.7.1.2	Messung der β -Galaktosidase Aktivität_____	63
3.7.1.3	Berechnung der relativen Luziferase-Aktivität_____	63
3.7.2	Herstellung von Proteinlysaten aus kultivierten Zellen_____	64
3.7.3	Proteinbestimmung nach Bradford_____	64
3.7.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)_____	64
3.7.5	Coomassie Färbung von SDS-Polyacrylamidgelen_____	65
3.7.6	Western-Blot_____	65
3.7.7	Immunpräzipitation_____	66
3.7.8	Chromatinimmunpräzipitationen_____	67
3.7.9	Herstellung von E2F6 Antisera_____	70
3.8	Die E2f6^{-/-} Maus_____	71
4	Ergebnisse_____	73
4.1	Die E2f6^{-/-} Maus_____	73
4.1.1	E2F6 defiziente Mäuse sind lebensfähig_____	73
4.1.2	E2f6 ^{-/-} Mäuse zeigen einen Defekt in der Spermatogenese_____	75
4.2	Untersuchungen E2F6 defizienter Fibroblasten_____	78
4.2.1	E2F6 defiziente murine embryonale Fibroblasten wachsen normal_____	78
4.2.2	E2F6 defiziente Fibroblasten zeigen eine normale Zellzyklus- verteilung_____	79
4.2.3	E2F6 defiziente Fibroblasten kehren aus der G0 Phase mit einer normalen Kinetik in den Zellzyklus zurück_____	81
4.2.4	Die Induktion von replikativer und onkogener Seneszenz in E2F6 defizienten Fibroblasten ist normal_____	82
4.3	Der Skelettphänotyp E2F6 defizienter Mäuse_____	85
4.3.1	Posteriore homeotische Transformationen in E2F6 defizienten Mäusen_____	85

4.3.2	Die Expression homeotischer Gene in E2F6 defizienten Embryonen_____	89
4.3.2.1	E2F6 ist in der Embryonalentwicklung ubiquitär exprimiert_____	90
4.3.2.2	Die Expression homeotischer Gene in E2f6 ^{-/-} Embryonen_____	91
4.4	Identifizierung E2F6 regulierter Gene_____	94
4.4.1	Expressionsanalyse von E2f6 ^{-/-} Fibroblasten_____	94
4.4.2	Bestätigung der verstärkten Expression von Stag3, Smc112 und XM_196054 in E2f6 ^{-/-} Fibroblasten_____	97
4.4.3	E2F6 reprimiert die Expression meiotischer Gene in somatischen Zellen_____	98
4.4.4	BRCA1 ist in E2f6 ^{-/-} embryonalen Fibroblasten normal exprimiert_____	99
4.4.5	Re-Expression von E2F6 in E2f6 ^{-/-} Fibroblasten reprimiert die Expression von Stag3, Smc112 und XM_196054_____	100
4.5	Untersuchung zur E2F6 vermittelten Repression von Stag3 und Smc112_____	102
4.5.1	Identifizierung eines E2F6 spezifischen Bindeelements im Smc112 Promotor_____	102
4.5.2	E2F6 bindet an den endogenen Stag3 Promotor_____	105
4.5.3	Der Stag3 Promotor ist in Abhängigkeit von E2F6 methyliert_____	106
4.5.4	Funktion der Histonmethylierungen in der E2F6 vermittelten Repression_____	108
4.5.5	Der Stag3 Promotor ist in E2f6 ^{-/-} Zellen acetyliert_____	110
4.5.6	Die E2F6 vermittelte Repression von Stag3 und Smc112 ist abhängig von Histondeacetylasen und einer DNA Methylierung_____	111
5	Diskussion_____	114
5.1	E2F6 in der Entwicklung_____	114
5.1.1	E2F6 ist nicht essentiell für die murine Embryonalentwicklung_____	114
5.1.2	Posteriore homeotische Transformationen in E2F6 defizienten Mäusen_____	115
5.1.3	Regulation von Hox Genen durch E2F6?_____	116
5.2	E2F6 und die Regulation des Zellzyklus_____	118
5.3	E2F6 regulierte Gene_____	120

5.3.1	E2F6 vermittelt die Repression meiotischer Kohäsine in somatischen Zellen_____	120
5.3.2	Folgen der Expression von Smc112 und Stag3 in E2F6 defizienten Zellen _____	121
5.4	Der Mechanismus einer E2F6 vermittelten Repression meiotischer Kohäsine _____	122
5.4.1	E2F6 bindet an den Stag3 Promotor_____	122
5.4.2	E2F6 abhängige Chromatinmodifikationen_____	123
5.4.3	Wie wird die Histonmethylierung am Stag3 Promotor vermittelt?_____	124
5.4.4	Welche Funktion haben die Histonmethylierungen am Stag3 Promotor?_____	126
5.4.5	Die E2F6 abhängige Repression und die Histondeacetylierung _____	126
5.4.6	Modell zur E2F6 vermittelten Repression_____	127
6	<i>Literaturverzeichnis</i> _____	129
7	<i>Zusammenfassung</i> _____	146
8	<i>Anhang</i> _____	149
8.1	Abkürzungsverzeichnis_____	149
8.2	Lebenslauf_____	153
8.3	Verzeichnis der akademischen Lehrer _____	154
8.4	Ehrenwörtliche Erklärung_____	155

1 Einleitung

1.1 pRb und E2F: Schaltstellen im Zellzyklus

Der Zellzyklus von Säugerzellen ist ein präzise regulierter Prozess, der durch den Einfluss zahlreicher Faktoren beeinflusst wird. Eine zentrale Rolle sowohl bei einer Aktivierung als auch bei einer Blockierung des Zellzyklus haben die Proteine der E2F Transkriptionsfaktoren und die mit ihnen assoziierten *Pocket* Proteine wie das Retinoblastoma Tumorsuppressorprotein (Dyson, 1998; Müller und Helin, 2000).

E2F Proteine wurden erstmals als zelluläre Aktivatoren beschrieben, die an ein spezifisches DNA Element im Promotor des adenoviralen E2 Gens binden (Kovesdi *et al.*, 1986; La Thangue und Rigby, 1987; Yee *et al.*, 1987). Verschiedene Studien zeigten daraufhin eine Bindung der E2F Proteine an das Retinoblastoma Protein pRb und an zwei weitere Proteine, p107 und p130 (*Pocket* Proteine; Lee *et al.*, 1987; Kaelin jr. *et al.*, 1991; Chellapan *et al.*, 1991). In Ergänzung dazu konnte gezeigt werden, dass E1A und anderen virale Onkoproteine wie das „large T-Antigen“ des SV-40 Virus oder das E7 Onkoprotein des humanen Papillomavirus durch die Bindung an *Pocket* Proteine E2F freisetzen, damit die Zellproliferation fördern und schließlich die Transformation der Zelle bewirken (Bandara and La Thangue, 1991; Dyson *et al.*, 1989; Whyte *et al.*, 1988; Whyte *et al.*, 1989; DeCaprio *et al.*, 1988; Ludlow *et al.*, 1989). Umgekehrt führt die Bindung von E2F an pRb, p107 oder p130 zu einer Inhibition der transaktivierenden Wirkung von E2F Proteinen und einer Repression E2F regulierter Gene (Flemington *et al.*, 1993; Helin *et al.*, 1993; Zamanian *et al.*, 1993). Darunter sind Gene, die für Zellzyklusregulatoren und für Proteine des Nukleotidstoffwechsels und der DNA Replikation kodieren (Ren *et al.*, 2002; Müller *et al.*, 2001; Ishida *et al.*, 2001; Weinmann *et al.*, 2001).

Die Komplexe aus E2F und *Pocket* Proteinen sind in Abhängigkeit vom Zellzyklus reguliert (Dyson, 1998). Es konnte gezeigt werden, dass pRb in Abhängigkeit vom Zellzyklus spezifisch phosphoryliert ist (Buchkovich *et al.*, 1989; Chen *et al.*, 1989; DeCaprio *et al.*, 1992). In der *G0* oder *G1* Phase des Zellzyklus bindet hypophosphoryliertes pRb an E2F und die transaktivierende Funktion von E2F ist blockiert (Shirodkar *et al.*, 1992; Ludlow *et al.*, 1990; Weintraub *et al.*, 1992). Mitogene Wachstumsfaktoren aktivieren die Cyclin-abhängigen Kinasen Cdk4/Ck6 (*Cyclin dependent kinases*; Cdk), die im Komplex mit Cyclin D die Phosphorylierung von pRb katalysieren (Lees *et al.*, 1991; Lin *et al.*, 1991; Nur-

se, 1990; Murray, 1992). Dies führt zur Dissoziation des E2F/pRb Komplexes, der Transaktivierung von E2F Zielgenen und dem Eintritt der Zelle in die S-Phase des Zellzyklus (Abbildung 1.1; Ludlow *et al.*, 1990; Harbour *et al.*, 1999; Dyson 1998).

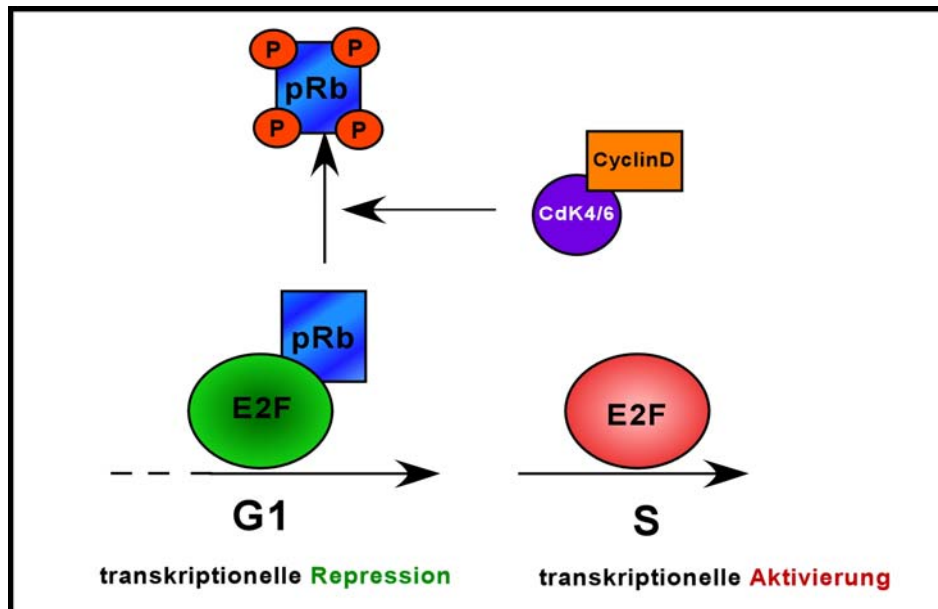


Abbildung 1.1: E2F wird durch pRb reguliert

In der *G1* Phase des Zellzyklus wird die Aktivität der E2F Transkriptionsfaktoren (E2F) durch die Bindung von hypophosphoryliertem *Pocket* Proteinen wie dem Retinoblastoma Protein (pRb) inhibiert. Dies resultiert in einer Repression E2F regulierter Gene. In Antwort auf mitogene Signale werden Cyclin abhängige Kinasen (Cyclin dependent kinases; CdKs; Cdk4 und Cdk6) aktiviert und katalysieren im Komplex mit Cyclin D (Cyclin D) die Phosphorylierung von pRb. Dies führt zur Freisetzung von E2F aus dem E2F/pRb Komplex, einer nachfolgenden transkriptionellen Aktivierung E2F regulierter Gene und dem Eintritt der Zelle in die S-Phase.

Zusammen bilden E2F und pRb somit eine zentrale Schaltstelle in der Regulation des Zellzyklus. Dies wird durch die Beobachtung bestätigt, dass in vielen Tumoren eine Inaktivierung des Retinoblastoma Proteins vorliegt oder die Mechanismen zur Regulation der E2F/pRb Komplexe inaktiviert sind (Bartek *et al.*, 1996; Sherr 1996).

1.2 Die Proteinfamilie der E2F Transkriptionsfaktoren

E2F Transkriptionsfaktoren bilden eine Proteinfamilie, der derzeit sieben Proteine zugeordnet werden können (Müller und Helin, 2000; Dyson, 1998). Weiterhin können zu dieser Familie funktionell die DP (*Differentiation Regulated Transcription Factor 1+2*; *DRTF*

1+2) Proteine gezählt werden, die mit E2F1-E2F5 heterodimerisieren und für die Bindung der E2F Proteine an die DNA notwendig sind (Girling *et al.*, 1993; Helin *et al.*, 1993; Bandara *et al.*, 1993). E2F1-E2F6 zeigen eine hoch konservierte DNA Binderegion sowie eine charakteristische DP Heterodimerisierungsdomäne (Dyson, 1998). Im Gegensatz dazu konnten im E2F7 Protein zwei aufeinander folgende E2F DNA Binderegionen identifiziert werden, jedoch fehlt eine DP Heterodimerisierungsdomäne (di Stefano *et al.*, 2003; de Bruin *et al.*, 2003; Logan *et al.*, 2004). E2F1-E2F5 haben eine im carboxyterminalen Proteinabschnitt lokalisierte Transaktivierungsdomäne, die gleichzeitig die Bindung an pRb, p107 oder p130 vermittelt (Helin, 1993). Sie werden daher als *Pocket* Protein abhängige E2F Proteine zusammengefasst. E2F6 und E2F7 fehlt diese Transaktivierungsdomäne. Beide binden nicht an *Pocket* Proteine und sind transkriptionelle Repressoren (Trimarchi *et al.*, 1998; Gaubatz *et al.*, 1998; Morckel *et al.*, 1997; Cartwright *et al.*, 1998; di Stefano *et al.*, 2003; de Bruin *et al.*, 2003; Logan *et al.*, 2004). Abbildung 1.2 fasst die Familie der E2F Transkriptionsfaktoren schematisch zusammen.

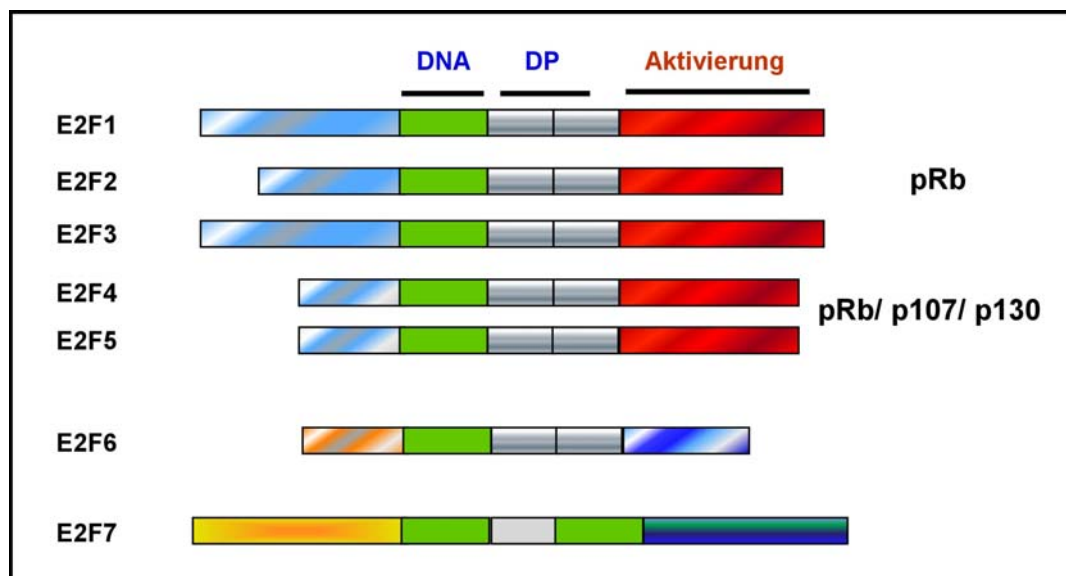


Abbildung 1.2: Die Proteinfamilie der E2F Transkriptionsfaktoren

E2F Transkriptionsfaktoren bilden eine Proteinfamilie, der derzeit sieben Proteine zugeordnet werden. E2F1-E2F6 besitzen eine konservierte DNA Binderegion (grün) und eine Domäne zur Heterodimerisierung mit dem DP Protein (*Differentiation Regulated Transcription Factor* 1+2; *DRTF* 1+2; grau). E2F7 besitzt zwei DNA Binderegionen, jedoch keine DP Heterodimerisierungsdomäne. E2F1-E2F5 zeigen eine charakteristische C-terminale Aktivierungsdomäne (rot). In diesem Bereich binden ebenfalls die *Pocket* Proteine pRb, p107 und p130. E2F6 und E2F7 besitzen keine Aktivierungsdomäne und interagieren nicht mit *Pocket* Proteinen.

Heterodimere E2F/DP Komplexe binden an die DNA Konsensussequenz (T(c/g)CCGC(c/g), die in den Promotoren zahlreicher Gene mit einer Funktion in der Zellproliferation identifiziert werden konnte (Ren *et al.*, 2002; Müller *et al.*, 2001; Ishida *et al.*, 2001; Weinmann *et al.*, 2001).

1.3 Die *Pocket* Protein regulierten E2F Proteine

1.3.1 Spezifität der *Pocket* Protein Interaktion von E2F1-E2F5

E2F1-E2F5 werden durch die Bindung an die *Pocket* Proteine pRb, p107 und p130 reguliert. E2F1 wurde erstmals als ein Rb bindendes Protein beschrieben und gezeigt, dass E1A die E2F1 Bindung an Rb inaktiviert (Helin *et al.*, 1992; Kaelin *et al.*, 1992). Im Anschluss daran wurden E2F2 und E2F3 als Rb interagierende Proteine mit einer Homologie zu E2F1 publiziert (Ivey-Hoyle *et al.*, 1993; Lees *et al.*, 1993). Im Unterschied zu E2F1-E2F3 wurden E2F4 und E2F5 über die Bindung an die *Pocket* Proteine p107 und p130 identifiziert (Dyson *et al.*, 1993; Beijersbergen *et al.*, 1994; Hijmans *et al.*, 1995; Vairo *et al.*, 1995). E2F5 interagiert sowohl mit p107 als auch mit p130, während E2F4 mit allen *Pocket* Proteinen interagiert und den größten Anteil zellulärer E2F/pRb Komplexe bildet (Dyson 1998; Moberg *et al.*, 1996). Im Vergleich zu E2F1-E2F3 ist die aminoterminal Region von E2F4 und E2F5 deutlich verkürzt. E2F1-3 weisen aminoterminal ein basisches Kernlokalisationssignal auf, während E2F4 und E2F5 ein Leucin/ Isoleucin reiches hydrophobes Kernexportsignal zeigen (Gaubatz *et al.*, 2001). Im Gegensatz zu E2F1-E2F3 sind somit E2F4 und E2F5 in wachsenden Zellen vorwiegend zytoplasmatisch lokalisiert und möglicherweise induziert erst die Bindung an pRb, p107 oder p130 die Translokation des E2F/*Pocket* Protein Komplexes in den Zellkern (Müller *et al.*, 1997; Verona *et al.*, 1997; Magae *et al.*, 1996; Gaubatz *et al.*, 2001). Auf diese Weise gelangen nur inhibitorische E2F4 und E2F5 Komplexe in den Nukleus.

1.3.2 Mechanismus der *Pocket* Protein vermittelten Repression

Die transkriptionsfördernde Aktivität von E2F Proteinen wird durch Histonacetylasen (*HATs*) vermittelt (Frolov and Dyson, 2004). Die Acetylierung von Histonproteinen indu-

ziert vermutlich eine gelockerte Struktur zwischen Histonproteinen und der DNA und ermöglicht somit die Transkription. Die Transaktivierungsdomäne von E2F1 interagiert mit CBP (*CREB-Binding Protein*), einer der ersten identifizierten Histonacetylasen (Trousse and Kouzarides, 1996). Weiterhin konnte die Assoziation von p300 und P/CAF sowie Komponenten des Tip60 Komplexes (Tip60, TRRAP, p400, Tip48 und Tip49) mit E2F Proteinen gezeigt werden (Martinez-Balbas, 2000; Marzio *et al.*, 2000; Morris *et al.*, 2000; Taubert *et al.*, 2004).

Eine negative Regulation der transaktivierenden Wirkung von E2F1-E2F5 erfolgt durch die *Pocket* Proteine pRb, p107 und p130. Dabei können zwei verschiedene Mechanismen unterschieden werden:

(1) Eine passive Repression erfolgt zunächst durch die Bindung der *Pocket* Proteine an ein Bindungsmotiv aus 18 Aminosäuren in der Transaktivierungsdomäne des E2F Proteins (Helin *et al.*, 1992; Flemington *et al.*, 1993; Helin *et al.*, 1993; Trimarchi *et al.*, 2002). Damit erfolgt eine Blockierung der Interaktion der Transaktivierungsdomäne mit transkriptions-aktivierenden Histonacetylasen.

(2) *Pocket* Proteine assoziieren mit Chromatin-modifizierenden Enzymen, die durch eine lokale Veränderung der Chromatinstruktur am Promotor die Transkription blockieren (Frolov and Dyson, 2004). So interagieren pRb, p107 und p130 mit den Klasse I Histondeacetylasen (HDAC1-HDAC3), die eine Funktion im Zellzyklus haben und von dem E2F/*Pocket* Protein Komplex an E2F regulierte Promotoren rekrutiert werden (Ferreira *et al.*, 1998; Ferreira *et al.*, 2001; Brehm *et al.*, 1998; Luo *et al.*, 1998; Magnaghi *et al.*, 1998). Histondeacetylasen inhibieren die Transkription eines Gens, vermutlich durch die Förderung einer kompakten, geschlossenen Chromatinstruktur (Hassig *et al.*, 1998).

Neben Histondeacetylasen interagieren Histonmethyltransferasen mit *Pocket* Proteinen. So assoziiert pRb mit der Histonmethyltransferase Suv39H1 und anhand des Cyclin E Promotors konnte eine E2F/pRb abhängige H3K9 Methylierung gezeigt werden, die eine Bindung von HP1 (**H**eterochromatin **P**roteins 1) ermöglicht und dadurch eine Inhibition der Cyclin E Expression ermöglicht (Nielsen *et al.*, 2001; Vandel *et al.*, 2001). Diese durch E2F/*Pocket* Protein Komplexe vermittelten Modifikationen und ihre Abhängigkeit vom Zellzyklus konnten an endogenen Promotoren beschrieben werden. Nicolas *et al.* detektierten in ruhenden Zellen eine Hypoacetylierung von Histon H3 Lysin 9 (H3K9) bzw. von Histon H3 Lysin 14 (H3K14) und eine spezifische Methylierung von H3K9 am E2F regulierten DHFR Promotor. Der Wiedereintritt der Zellen in den Zellzyklus führte zu einem Rückgang der H3K9 Methylierung und einer gleichzeitigen H3K9 Acetylierung (Nicolas *et*

al., 2003). Für den Cyclin A und cdc6 Promotor konnte ebenfalls eine Methylierung von H3K9 in ruhenden Zellen und eine Acetylierung und gleichzeitige Bindung von E2F1 nach Eintritt in den Zellzyklus beobachtet werden (Gosh and Harter, 2003). Abbildung 1.3 fasst am Beispiel des E2F/pRb Komplexes den Mechanismus der pRb vermittelten Repression zusammen.

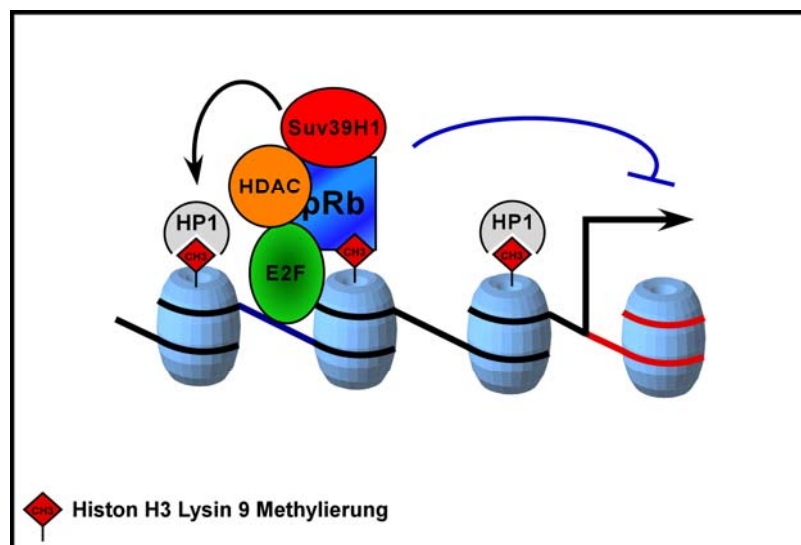


Abbildung 1.3: Modell zur pRb vermittelten aktiven Repression

Das Retinoblastoma Protein pRb rekrutiert Chromatin modifizierende Enzyme an den E2F regulierten Promotor: Durch Histondeacetylasen (HDACs) werden Histonproteine deacetyliert und nachfolgend durch Histonmethyltransferasen (z.B. Suv39H1) am Lysin 9 des Histon H3 (H3K9) methyliert. Diese Methylierung bildet eine Bindestelle für die Chromodomäne des Heterochromatin Protein 1 (HP1), das eine lokale geschlossene Chromatinstruktur induziert und dadurch die die Transkription blockiert.

Neben kovalenten Modifikationen von Histonproteinen scheint eine *Pocket* Protein Repression auch durch die Aktivität von Proteinkomplexen vermittelt zu werden, die eine Struktur des Chromatins unter ATP Verbrauch reorganisieren (Narlikar *et al.*, 2002). Die Homologe des SWI/SNF Nukleosomen-Organisationskomplexes aus der Hefe, BRG1 und hBRM interagieren beide mit pRb (Dunaief *et al.*, 1994; Strober *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 2000).

Dahiya *et al.* wiesen außerdem die Assoziation von pRb mit Polycomb Proteinen nach, womit sich eine Möglichkeit für eine stabile und vererbare E2F/pRb vermittelte Transkriptionssinhibition ergibt (Dahiya *et al.*, 2001).

1.3.3 Funktion der *Pocket* Protein regulierten E2F Proteine im Zellzyklus

Untersuchungen zur Funktionen *Pocket* Protein abhängiger E2F Proteine unter Verwendung unterschiedlicher experimenteller Ansätze ergaben sowohl spezifische als auch überlappende Funktionen der E2F Proteine im Zellzyklus.

In transienten Reporteranalysen unter Verwendung von E2F regulierten Promotoren zeigen E2F1-E2F5 eine transkriptionsaktivierende Wirkung. Die jeweilige transiente Überexpression von E2F1-E2F5 resultiert zudem in einer Aktivierung zellzyklusabhängiger Gene und einer beschleunigten Zellproliferation (DeGregori *et al.*, 1997; Lukas *et al.*, 1996; Vigo *et al.*, 1999).

Expressionsanalysen zeigten, dass E2F1, E2F2 und E2F3 in Abhängigkeit vom Zellzyklus reguliert und exprimiert werden (Lees *et al.*, 1993; Leone *et al.*, 1998). Ihre Überexpression in ruhenden, quieszenten Zellen (*G0*) führt zu einem Wiedereintritt der Zellen in den Zellzyklus und kann einen *p16* (*Cdk*-Inhibitor; *CKI*) induzierten *G1* Arrest der Zellen aufheben (Johnsons *et al.*, 1993; Qin *et al.*, 1994; Lukas *et al.*, 1996; DeGregori *et al.*, 1995; Mann *et al.*, 1996). E2F4 und E2F5 werden dagegen konstitutiv im Zellzyklus exprimiert, am stärksten jedoch in der *G0* Phase (Ikeda *et al.*, 1996; Moberg *et al.*, 1996). Im Unterschied zu E2F1-E2F3 führt die Überexpression von E2F4 und E2F5 in *G0* nur zu einem schwachen Wiedereintritt der Zellen in die *S*-Phase (Dyson *et al.*, 1993; Beijersbergen *et al.*, 1994; Hijmans *et al.*, 1995; Vairo *et al.*, 1995; Mann *et al.*, 1996).

Weitere Hinweise auf die Funktion der *Pocket* Protein regulierten E2F Proteine lieferten die Untersuchungen zur Proliferation E2F defizienter muriner embryonaler Fibroblasten. Im Unterschied zu E2F1 oder E2F2 defizienten Fibroblasten konnte nur in E2F3 defizienten Fibroblasten ein Defekt in der Zellproliferation und eine reduzierte Aktivierung E2F regulierter Zellzyklusgene beobachtet werden (Humbert *et al.*, 2000). Zwar lässt dies auf eine spezifische Funktion von E2F3 in der Aktivierung des Zellzyklus schließen, jedoch konnte auch eine inhibitorische Funktion von E2F3 beobachtet werden. So zeigten Aslanian *et al.* eine verstärkte *p19^{ARF}* Expression in E2F3 defizienten Fibroblasten und es konnte eine spezifische Repression des *p19^{ARF}* Promotors durch E2F3 beobachtet werden (Aslanian *et al.*, 2004). Es ist jedoch unklar, ob es sich hierbei um eine physiologische Funktion von E2F3 handelt.

Die aktivierende Funktion im Zellzyklus ist außerdem nicht spezifisch auf E2F3 beschränkt, da *E2f3^{-/-}E2f1^{-/-}* oder *E2f3^{-/-}E2f2^{-/-}* Fibroblasten einen verstärkten Defekt der Zellproliferation zeigen und die Deletion von *E2f1-E2f3* zu einem vollständigen Wachs-

tumsstopp und einer fehlenden Aktivierung von E2F regulierten Genen führt (Wu *et al.*, 2001). Dies deutet auf überlappende Funktionen dieser E2F Proteine in der Aktivierung und Förderung der Zellproliferation hin.

E2f4^{-/-} oder E2f5^{-/-} Fibroblasten proliferieren normal und können im Zellzyklus arretieren. E2f4^{-/-}E2f5^{-/-} Fibroblasten zeigen ebenfalls keinen signifikanten Defekt der Zellproliferation, jedoch können sie nicht in Antwort auf eine Überexpression des Cdk-Inhibitors p16^{Ink4a} im Zellzyklus arretieren (Gaubatz *et al.*, 2000).

Durch die Verwendung von *Microarray* Analysen wurde ein breites Spektrum an E2F Zielgenen identifiziert. Somit konnten die möglichen Funktionen der E2F Proteine genauer charakterisiert werden. E2F Zielgene sind an der *G1/S* Regulation beteiligt, regulieren den Nukleotidstoffwechsel und die Replikation der DNA in der *S*-Phase des Zellzyklus. Es konnten aber auch Zielgene identifiziert werden, die in der *G2* Phase des Zellzyklus exprimiert werden, eine Funktion in der Mitose haben, apoptotische Prozesse regulieren oder an Zelldifferenzierungen in der Embryonalentwicklung beteiligt sind. Jedoch ist zu beachten, dass mit diesem auf der Überexpression einzelner E2F Proteine basierenden experimentellen Ansatz nur eine mögliche Regulation dieser Gene gezeigt werden kann. Inwiefern diese Gene physiologische E2F regulierte Gene bilden, kann ebenso wenig daraus abgeleitet werden wie eine Spezifität einzelner E2F Proteine für diese Zielgene.

Einen wichtigen Schritt zur Untersuchung einer E2F spezifischen Regulation von Genen bildete die Entwicklung der „*ChIP-on-Chip*“ Technologie. Mit dieser Methode konnten endogene Zielgene von E2F1-E2F5 identifiziert werden (Wells *et al.*, 2000; Takahashi *et al.*, 2000). Durch Chromatinimmunpräzipitationen (ChIPs) werden bei dieser Methode spezifische E2F/DNA Komplexe isoliert und mit einem Promotor spezifischen *Microarray* hybridisiert. Interessanterweise konnten E2F4 und E2F5 bei diesem experimentellen Ansatz, im Einklang mit ihrer Expression in *G0*, ausschließlich auf Promotoren in quieszenten Zellen detektiert werden. Im Unterschied dazu wurden E2F1-E2F3 spezifisch in der *G1/S* Phase auf diesen Promotoren nachgewiesen. Diese Beobachtungen bildeten die Grundlage für die Vermutung, dass die pRB regulierten E2F1-E2F3 Proteine eine vorwiegend aktivierende Funktion im Zellzyklus einnehmen. Im Gegensatz dazu ist für die durch pRb, p107 und p130 regulierten E2F4 und E2F5 Proteine eine überwiegend repressorische Funktion in *G0* zu vermuten (Trimarchi und Lees, 2002).

1.3.4 Die Funktion der *Pocket* Protein regulierten E2F Proteine in der Entwicklung

Die Untersuchung von Mäusen, in denen die jeweiligen Gene von E2F1-E2F5 durch eine gezielte homologe Rekombination deletiert wurden, ergänzten die *in-vitro* erhaltene Evidenz für sowohl spezifische als auch redundante Funktionen der E2F Proteine *in-vivo*.

E2F1 defiziente Mäuse sind lebensfähig, zeigen jedoch eine testikuläre Atrophie und eine erhöhte Anzahl von T-Zellen, die nur schwach auf eine Stimulation durch Antigene reagieren (Zhu *et al.*, 2001; Field *et al.*, 1996; Yamasaki *et al.*, 1996). Ältere E2F1 defiziente Mäuse entwickeln Tumore, so dass E2F1 als ein Tumorsuppressorprotein eingeordnet wurde. Diese Beobachtung war überraschend, da biochemische Studien, wie die E2F1 Überexpression und der Nachweis von E2F1 auf den Promotoren E2F regulierter Zellzyklusgene in der G1/S Phase des Zellzyklus, auf eine die Zellproliferation fördernde, onkogene Funktion von E2F1 schließen lassen. Zum einen deuten diese Beobachtungen daraufhin, dass E2F1 notwendig zur Bildung von inhibitorischen E2F/pRb Komplexen ist. Zum anderen können die tumorsuppressorischen Eigenschaften von E2F1 mit einer Funktion von E2F1 in der Induktion apoptotischer Prozesse begründet werden (Qin *et al.*, 1994; Shan *et al.*, 1994; Wu *et al.*, 1994; Hiebert *et al.*, 1995).

Im Gegensatz dazu zeigen E2F2 defiziente Mäuse eine deregulierte Proliferation von hämatopoetischen Zellen in Antwort auf eine Stimulation mit Antigenen. Infolgedessen entwickeln E2f2^{-/-} Mäuse Autoimmunerkrankungen und Diabetes (Murga *et al.*, 2001).

Die Deletion des E2f3 Gens führt zu schweren Defekten in der Embryonalentwicklung, ein Großteil der E2F3 defizienten Mäuse stirbt *in-utero* bzw. postnatal an einer gestörten Herzfunktion (Humbert *et al.*, 2000).

Die organspezifischen Phänotypen in den Deletionsmutanten der aktivierenden E2F Proteine weisen auf eine spezifische Funktion von E2F1, E2F2 und E2F3 in der Embryonalentwicklung hin. Gleichzeitig zeigt jedoch eine Kombination aus E2f3^{-/-} mit einer E2f1 oder E2f2 Deletion eine Verstärkung des letalen E2f3^{-/-} Phänotyps. E2f3^{-/-}E2f1^{-/-} und E2f3^{-/-}E2f2^{-/-} Mäuse sterben ca. am Tag 9.5 der Embryonalentwicklung (Wu *et al.*, 2001; Cloud *et al.*, 2002). Dieser synergistische Effekt auf den Phänotyp der E2f3^{-/-} Mäuse deutet auf eine redundante Funktion von E2F Proteinen in der Embryonalentwicklung hin.

E2F4 defiziente Mäuse sind kleinwüchsig, zeigen Defekte in der Erythropoese, kraniofaziale Störungen und ein verdicktes Darmepithel (Humbert *et al.*, 2000; Rempel *et al.*, 2000). E2f5^{-/-} Mäuse entwickeln postnatal einen Hydrozephalus durch eine erhöhte Sek-

retion von Liquorflüssigkeit durch den Plexus Choroideus (Lindemann, 1998). Diese Phänotypen deuten auf eine organ- und zellspezifische Funktion von E2F4 und E2F5 hin. Untersuchungen der hämatopoetischen Defekte in E2F4 defizienten Mäusen zeigten, dass die hämatopoetischen Zellen normal proliferieren, jedoch einen Defekt in der terminalen Differenzierung aufweisen (Humbert *et al.*, 2000). Möglicherweise liegt also somit die spezifische Funktion von E2F4 und E2F5 *in-vivo* in der Regulation von Zelldifferenzierungen. E2f4^{-/-}-E2f5^{-/-} Mäuse sterben in der späten Embryonalentwicklung (Gaubatz *et al.*, 2000). So scheint also ein Allel von E2F4 oder E2F5 für die Embryonalentwicklung notwendig zu sein. Diese Beobachtung deutet auf eine redundante Funktion von E2F4 und E2F5 während der Embryonalentwicklung hin.

1.4 Die *Pocket* Protein unabhängigen E2F Proteine

1.4.1 E2F7

E2F7 fehlt die für E2F1-E2F5 charakteristische Transaktivierungsdomäne und bindet nicht an *Pocket* Proteine. Im Unterschied zu allen anderen E2F Proteinen zeigt E2F7 keine Heterodimerisierung mit DP Proteinen, sondern bindet über zwei E2F DNA Binderegionen an E2F Konsensussequenzen (Di Stefano *et al.*, 2001).

In Untersuchungen mit E2F regulierten Reportergenen konnte eine Repression durch E2F7 nachgewiesen werden (de Bruin *et al.*, 2003; Di Stefano *et al.*, 2003). Es ist unklar, wie diese Repression durch E2F7 vermittelt wird.

Die Expression von E2F7 ist in Abhängigkeit vom Zellzyklus reguliert und kann durch E2F1 aktiviert werden (de Bruin *et al.*, 2003; Di Stefano *et al.*, 2003). Die Überexpression von E2F7 blockiert die Zellproliferation und führt zu einem Arrest der Zellen in der S-Phase (Di Stefano *et al.*, 2003). De Bruin *et al.* zeigten dagegen eine schwache Akkumulation von E2F7 überexprimierenden Zellen in der G2-Phase (deBruin *et al.*, 2003).

Der Nachweis von E2F7 auf endogenen Promotoren E2F regulierter Gene in Abhängigkeit vom Zellzyklus führte zu dem Modell, dass E2F7 während der Replikation G1 spezifische Gene reprimiert (Di Stefano *et al.*, 2003). Es bleibt abzuwarten, welche physiologische Funktion E2F7 ausübt.

1.4.2 E2F6

E2F6 zeigt eine zu E2F1-E2F5 homologe DNA Bindungs- und DP Dimerisierungsdomäne, die *in-vitro* eine Bindung an E2F Konsensussequenzen vermittelt. Weiterhin konnte in E2F6 die für E2F1-E2F5 charakteristische *marked box* identifiziert werden. E2F6 besitzt jedoch keine Transaktivierungsdomäne und keine *Pocket* Protein Bindungsdomäne (Morkele *et al.*, 1997; Cartwright *et al.*, 1998; Gaubatz *et al.*, 1998; Trimarchi *et al.*, 1998)

In-vitro Untersuchungen mit E2F regulierten Reportergenen zeigten, dass E2F6 ein von *Pocket* Proteinen unabhängiger transkriptioneller Repressor ist, und die transaktivierende Wirkung von E2F1 inhibieren kann. Die transkriptionsinhibierende Aktivität von E2F6 ist abhängig von der DNA Bindung und es konnte eine Repressionsdomäne im C-Terminus von E2F6 lokalisiert werden (Gaubatz *et al.*, 1998).

Der E2F6 Locus kodiert für zwei Isoformen von E2F6 (Kherrouche *et al.*, 2001). Die Expression von E2F6 und einer aminoterminal verkürzten Variante, bezeichnet als E2F6b, konnte nachgewiesen werden (Dahme *et al.*, 2002). Beide Formen des E2F6 Proteins werden in der Maus ubiquitär exprimiert. E2F6 und E2F6b sind beide schwach in asynchron wachsenden, murinen Fibroblasten exprimiert, jedoch zeigt sich eine stärkere Expression beider E2F6 Formen in synchronisierten Zellen in der späten *G1* und frühen *S*-Phase des Zellzyklus (Dahme *et al.*, 2002).

Cartwright *et al.* beobachteten, dass E2F6 nach Überexpression eine Akkumulation von Zellen in der *S*-Phase induziert (Cartwright *et al.*, 1998). Dagegen zeigten Gaubatz *et al.*, dass die E2F6 Überexpression in quieszenten Zellen den Wiedereintritt der Zellen in den Zellzyklus verzögert (Gaubatz *et al.*, 1998).

1.4.2.1 E2F6 und Polycomb Proteine

Verschiedene Studien zeigten die Interaktion von E2F6 mit Polycomb Proteinen. In einem Hefe Interaktionsversuch konnten Trimarchi *et al.* die Polycomb Proteine RYBP, RinG1, MEL-18, mph1 und Bmi1 als E2F6 assoziierte Proteine identifizieren (Trimarchi *et al.*, 2001). Ogawa *et al.* reinigten aus HeLa Kernextrakten einen E2F6 Multiproteinkomplex auf, der u.a. die Polycomb Proteine Ring1 und Ring2, hMBLR, *h-l(3)mbt-like protein* und YAF2 enthielt (Ogawa *et al.*, 2002).

Polycomb Proteine wurden erstmals in der Fruchtfliege *Drosophila Melanogaster* (*Drosophila*) beschrieben und nachfolgend ihre Homologe in Säugerzellen identifiziert (Jacobs and van Lohuizen, 2002; Levine *et al.*, 2002). Polycomb Proteine vermitteln eine dauerhafte und stabile Repression homeotischer Gene (Hox Gene) (Schumacher und Magnuson, 1997). Im Einklang dazu resultieren Polycomb Mutationen in *Drosophila* und Säugern in einer fehlerhaften und deregulierten Expression spezifischer Hox Gene, die eine Veränderung der Körpersegmentierung zur Folge hat (Cilio *et al.*, 2001; Kessel and Gruss, 1990 und 1991; Gruss and Kessel, 1991; Akasaka *et al.*, 1996 und 2001; van der Lugt *et al.*, 1994 und 1996). Neben der stabilen Repression homeotischer Gene haben Polycomb Proteine auch eine Funktion in der Zellproliferation. So reprimiert das Polycomb Protein Bmi1 den *INK4/ARF* Locus und reguliert somit Proliferation, Seneszenz und Apoptose (Jacobs *et al.*, 1999).

Polycomb Proteine assoziieren in mindestens drei verschiedenen Multiproteinkomplexen:

- (1) Der PRC-1 Komplex (***Polycomb Repressive Complex 1***) besteht aus den Polycomb Proteinen M33 (HPC-1; Cbx-2), HPC-2 (Cbx-4), HPC-3 (Cbx-8), Bmi1, Mel18 und Ring1 (Shao *et al.*, 1999; Levine *et al.*, 2002).
- (2) Der PRC-2 Komplex setzt sich aus den Polycomb Proteinen EZH2 (***Enhancer of Zeste Homologue 2***), EED (***Embryonic Ectoderm Development***), SUZ12 (***Suppressor of Zeste 12, JJAZ1***) und RbAp48 zusammen (Cao *et al.*, 2002; Czermin *et al.*, 2002; Kuzmichev *et al.*, 2002; Muller *et al.*, 2002).
- (3) Der erst kürzlich *in-vitro* aus HeLa Kernextrakten isolierte PRC-3 Komplex ist, bis auf eine *Splice*-Variante des EED Proteins, identisch mit dem PRC-2 Komplex (Kuzmichev *et al.*, 2004).

Die Identifizierung einer Aktivität zur Histonmethylierung im PRC-2 bzw. PRC-3 Komplex lieferte erste Evidenz für den Mechanismus einer Polycomb vermittelten Repression der Transkription und einem sequentiellen Zusammenwirken der Polycomb Komplexe (Cao und Zhang, 2004). Für den PRC-2 Komplex konnte eine spezifische Aktivität zur Methylierung des Lysin 27 im Histon H3 (H3K27) *in-vitro* und *in-vivo* gezeigt werden (Cao *et al.*, 2002). Die spezifische Methylierung von H3K27 ermöglicht die Bindung von PRC-1, vermutlich über die Chromodomänen von M33, HPC2 (Cbx4) oder HPC-3 (Cbx8) (Cao *et al.*, 2002; Shao *et al.*, 1999; Levine *et al.*, 2002). Die Bindung von PRC-1 an methyliertes H3K27 blockiert die Rekrutierung transkriptionsaktivierender Faktoren, induziert eine geschlossene und kompakte Chromatinstruktur oder blockiert direkt die Aktivität der RNA Polymerase (Cao und Zhang, 2004; Dellino *et al.*, 2004). Dieses Zusammenwir-

ken der Polycomb Komplexe konnte exemplarisch an dem *Ultrabithorax* Promotor in *Drosophila* gezeigt werden (Wang *et al.*, 2004).

Polycomb Proteine besitzen keine klassischen DNA Bindungsmotive, einzige Ausnahme bilden das *Drosophila* Polycomb Protein PHO (**P**leio**h**omeotic), als dessen Homolog der Transkriptionsfaktor YY1 (**Y**ing-**Y**ang-1) beschrieben wurde (Brown *et al.*, 1998) sowie das Polycomb Protein Mel18 (Kanno *et al.*, 1995; Akasaka *et al.*, 1996). Jedoch ist unklar, welche physiologische Relevanz diese Proteine bei der Rekrutierung der Polycomb Komplexe an die DNA haben. Mohd-Sarip *et al.* zeigten in diesem Zusammenhang, dass PHO alleine nicht ausreicht, um Polycomb Komplexe stabil an DNA zu binden (Mohd-Sarip *et al.*, 2002).

Die Interaktion von E2F6 mit Polycomb Proteinen lässt daher vermuten, dass E2F6 möglicherweise sequenzspezifisch Polycomb Proteine an Promotoren rekrutiert und dadurch eine Repression vermittelt. Dies ist eine der Fragen, die im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden soll.

1.4.2.2 E2F6 und das Mga/Max Heterodimer

Neben Polycomb Proteinen konnte in dem von Ogawa *et al.* gereinigten E2F6 Proteinkomplex mit dem Mga/Max Heterodimer (*Max gene associated protein*) eine weitere DNA Bindeaktivität identifiziert werden (Ogawa *et al.*, 2002). Die Assoziation von murinem E2F6 mit dem Mga Protein konnte in eigenen Untersuchungen *in-vivo* bestätigt werden.

Mga gehört zur Familie der basischen „*Helix-Loop-Helix leucine zipper*“ Transkriptionsfaktoren, die durch Assoziation mit Max an spezifische DNA Konsensussequenzen (CACGTG; E-Box) binden (Hurlin *et al.*, 1999). Mga wirkt in diesem Zusammenhang antagonistisch zu der transformierenden Aktivität des E-Box bindenden Myc Onkoproteins (Hurlin *et al.*, 1999). Eine zweite DNA Bindung von Mga wird über die T-Domäne im N-Terminus vermittelt.

T-Domänen sind das charakteristische DNA Bindemotiv der T-Box Transkriptionsfaktoren und des Brachyury Proteins, die eine Funktion sowohl in der Embryonalentwicklung als auch im Zellzyklus haben (Kispert und Herrmann, 1993; Müller and Herrmann, 1997; Papaioannou and Silver, 1998).

Somit könnte der E2F6 Proteinkomplex an E2F regulierte Promotoren über die DNA Bindedomäne von E2F6 und gleichzeitig an E-Boxen in Myc/Max regulierten Promotoren ü-

ber das Mga/Max Heterodimer binden (La Thangue, 2002). Zudem könnte über die T-Domäne eine Bindung an T-Box und Brachyury regulierte Promotoren vermittelt werden.

1.4.2.3 E2F6 und Histonmethyltransferasen

Ogawa *et al.* identifizierten die Histonmethyltransferasen (HMTase) G9a und eine neue HMTase, die als EuHMTase bezeichnet wurde, als weitere Komponenten des E2F6 Multiproteinkomplexes (Ogawa *et al.*, 2002; Tachibana *et al.*, 2001). Weitere Bestandteile bildeten eine Isoform des HP1 Proteins (**H**eterochromatin **P**rotein **1**), das HP1 γ . Neben seiner Funktion zur Bildung von Heterochromatin ist HP1 an der Inhibition euchromatischer Gene beteiligt (Lachner *et al.*, 2001; Bannister *et al.*, 2001; Nielsen *et al.*, 2001; Schultz DC *et al.*, 2002; Ogawa *et al.*, 2002).

G9a und EuHMTase methylieren spezifisch *in-vitro* und *in-vivo* das Lysin 9 im Histon H3 Protein (H3K9; Tachibana *et al.*, 2001; Tachibana *et al.*, 2002; Ogawa *et al.*, 2002). Die spezifische Dimethylierung von H3K9 korreliert mit einer Inhibition der transkriptionellen Aktivität des Promotors (Noma *et al.*, 2001; Nakayama *et al.*, 2001; Lachner *et al.*, 2003). HP1 bindet über seine Chromodomäne an dimethyliertes H3K9, induziert die Bildung einer fakultativen, lokal begrenzten Heterochromatinstruktur, die eine Aktivität der basalen Transkriptionsmaschinerie blockiert (Lachner *et al.*, 2001; Ayyanathan *et al.*, 2003). Somit schlugen Ogawa *et al.* einen E2F6 Repressionsmechanismus vor, der durch die Aktivität von Histonmethyltransferasen die nachfolgende Rekrutierung von HP1 γ vermittelt.

1.4.2.4 E2F6 regulierte Gene in humanen Tumorzellen

Ogawa *et al.* wiesen Komponenten des E2F6 Komplexes in humanen HeLa Tumorzellen mit ChIPs auf den Promotoren E2F regulierter Gene ausschließlich in der G0, jedoch nicht in der G1 Phase des Zellzyklus nach (Ogawa *et al.*, 2002).

Oberley *et al.* verwendeten die „ChIP-on-Chip“ Technologie (siehe 1.3.3) zur Identifizierung von E2F6 regulierten Genen. Dabei konnten sie in humanen 293T Tumorzellen u.a. BRCA-1 (**B**reast **C**ancer **a**ssociated **P**rotein **1**) und die BRCA1 regulatorischen Proteine CtIP (**C**t**I**P-**I**nteracting **P**rotein) und CHEK2 (**C**ell-**C**ycle **C**heckpoint **K**inase **2**) sowie die

Gene für HP1 und RbAp 48 (*Rb-Associated protein 48*) als Zielgene des humanen E2F6 identifizieren (Oberley *et al.*, 2003).

Interessanterweise detektierten Oberley *et al.* an den Promotoren dieser Gene keine H3K9 Methylierung. Im Gegensatz dazu konnte eine signifikante Zunahme der E2F1 Bindung an diese Promotoren nach *RNAi* induzierter E2F6 Reduktion beobachtet werden.

1.4.2.5 Der E2F6 vermittelte Repressionsmechanismus

Aus den Studien von Ogawa *et al.* und Oberley *et al.* ergeben sich zwei verschiedene Modelle, die einen E2F6 vermittelten Repressionsmechanismus beschreiben.

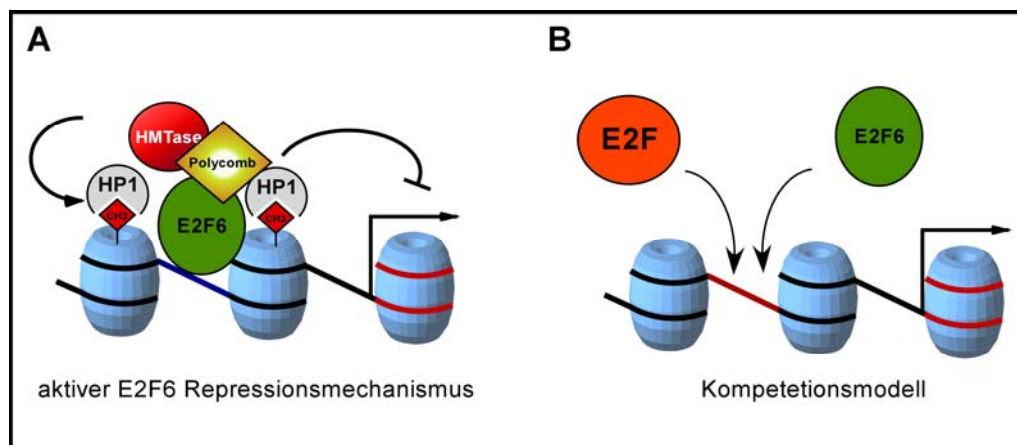


Abbildung 1.4: Modelle zur E2F6 vermittelten Repression

(A) Repression durch einen E2F6 Multiproteinkomplex: E2F6 rekrutiert Chromatin modifizierende Enzyme wie Histonmethyltransferasen (HMTasen), HP1 und Polycomb Proteine an E2F6 regulierte Promotoren und vermittelt eine Repression durch eine lokale Veränderung der Chromatinstruktur (*aktiver E2F6 Repressionsmechanismus*, vgl. Ogawa *et al.*, 2002). (B) E2F6 konkurriert mit aktivierenden E2F Transkriptionsfaktoren, z.B. E2F1 um dieselbe Bindestelle im Promotor eines E2F regulierten Gens. Die Bindung von E2F6 blockiert die Bindung von E2F1 und damit die Aktivierung des Promotors (*passive Repression*, vgl. Oberley *et al.*, 2003).

Auf der einen Seite steht das von Ogawa *et al.* vorgeschlagene Modell der E2F6 vermittelten aktiven Repression durch Histonmethylierungen von E2F6 assoziierten HMTasen und einer nachfolgender HP1 Bindung.

Auf der anderen Seite steht das von Oberley *et al.* beschriebene Kompetitionsmodell zur E2F6 regulierten Genexpression. Dabei konkurrieren E2F6 und E2F1 um die Bindung an E2F Bindestellen in den Promotoren dieser Gene und E2F6 inhibiert die Genexpression

passiv durch die Blockierung der E2F1 Bindung. Beide Modelle sind in Abbildung 1.4 zusammengefasst. Es ist unklar, welcher Mechanismus *in-vivo* vorliegt oder ob beide Mechanismen *in-vivo* koexistieren.

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist es, grundlegende Einblicke in die biologische Funktion von E2F6 *in-vivo* zu gewinnen. Hierzu sollte eine E2F6 defiziente Maus unter Beachtung folgender Fragestellungen analysiert und charakterisiert werden:

1. Welche Funktion hat E2F6 in der Entwicklung?

E2F Proteine zeigen spezifische und redundante Funktionen während der murinen Embryonalentwicklung. Um zu untersuchen, ob E2F6 eine Funktion in der Mausentwicklung hat, sollte zunächst überprüft werden, ob E2F6 defiziente Mäuse lebensfähig sind bzw. eine normale postnatale Entwicklung zeigen. Weiterhin sollten verschiedene Organe histologisch analysiert werden, um mögliche organspezifische Funktionen von E2F6 zu identifizieren.

2. Welche Funktion übt E2F6 im Zellzyklus aus?

Da E2F6 durch seine DNA Bindungs- und Dimerisierungsdomäne an E2F regulierte Promotoren *in-vitro* bindet, ist eine Funktion von E2F6 in der Regulation von E2F regulierten Zellzyklusgenen denkbar. Erste biochemische Untersuchungen deuteten auf eine Funktion von E2F6 im Zellzyklus hin. Die Interaktion von E2F6 mit dem Polycomb Protein Bmi1 lässt eine Funktion von E2F6 in der Regulation des p19^{ARF} Promotors vermuten. E2F6 konnte außerdem auf Promotoren Zellzyklus regulierter Gene spezifisch in der G0 Phase des Zellzyklus nachgewiesen werden. Daher bildet einen Schwerpunkt in dieser Arbeit die Untersuchung der Proliferation von E2F6 defizienten murinen Fibroblasten.

3. Welche Bedeutung hat die Interaktion von E2F6 mit Polycomb Proteinen?

Die Interaktion von E2F6 mit Polycomb Proteinen wurde in zwei unabhängigen Studien gezeigt, jedoch ist ihre biologische Relevanz unklar. Es ist denkbar, dass E2F6 zu einer Rekrutierung verschiedener Polycomb Multiproteinkomplexe während der Zellproliferation, der Zelldifferenzierung und der Embryonalentwicklung beiträgt.

4. Wie wird die E2F6 induzierte Repression vermittelt?

Durch die Arbeiten von Ogawa *et al.* und von Oberley *et al.* werden zwei verschiedene Modelle zur E2F6 vermittelten Repression diskutiert. Es sollte daher im Rahmen dieser Arbeit Evidenz für eines der beiden Modelle erarbeitet werden. Hierzu sollte zunächst versucht werden, E2F6 regulierte Zielgene in murinen primären Zellen zu identifizieren. Anhand dieser Gene soll die E2F6 vermittelte Repression beschrieben und charakterisiert werden. Hierbei ist es von besonderem Interesse zu fragen, ob Histonmethyltransferasen, Polycomb Proteine und andere Chromatin-modifizierende Proteine beteiligt sind.

2 Material

2.1 Mauslinien, Bakterienstämme und Zelllinien

2.1.1 Mäuse

2.1.1.1 *Mus Musculus*, die europäische Hausmaus

In dieser Arbeit wurde die biologische Funktion von E2F6 unter Verwendung der europäischen Hausmaus (*Mus Musculus*) als Tiermodell untersucht. Tabelle 2.1 fasst die wichtigsten Daten zu dieser Maus zusammen.

<i>Mus Musculus</i>		
Genom	Chromosomenanzahl	40
	Anzahl der Gene	$0.5-1 \times 10^5$
	DNA (diploid)	3×10^9 Basenpaare
Reproduktion	Tragzeit	19-20 Tage
	Geschlechtsreife	ca. 6 Wochen
	Absetzalter	ca. 21 Tage
	Gewicht bei Geburt	ca. 1g
	Gewicht (adult)	30g-40g (Männchen > Weibchen)
	Lebenszeit (Labor)	1.5 – 2.5 Jahre
	Wurfgröße	4-8 Tiere

Tabelle 2.1: *Mus Musculus*, die europäische Hausmaus

2.1.1.2 Verwendete Inzucht-Mausstämme

Als Inzucht-Mausstämme bezeichnet man Mäuse, die aus Kreuzungen unter Geschwistern oder zwischen Nachkommen und Elterngenerationen hervorgehen. Um einen Mausstamm als Inzuchtstamm zu bezeichnen, müssen mindestens 20 Generationen gekreuzt werden. Tiere eines Inzuchtstammes sind nahezu homozygot, d.h., sie haben ein identisches genetisches Material mit Ausnahme einzelner spontaner Mutationen. Inzuchtmäuse bieten

daher einen definierten und konstanten genetischen Hintergrund für *in-vivo* Analysen (Festing, 1989).

Zu den gut etablierten Inzucht-Mausstämmen gehören die C57/Bl.6 Maus und die Balb/C Maus, die in vielen Laboratorien gehalten und für genetische Analysen verwendet werden. Der C57/Bl.6 Inzuchtstamm lässt sich aus Mäusen der um 1900 von Abbie Lathrop gegründeten Mausfarm in Granby ableiten. C57 war die Bezeichnung einer weiblichen Maus aus diesem Laboratorium, die über weitere Züchtungen, u.a. durch Clarence C. Little, zum heute etablierten C57/Bl.6 Inzucht-Mausstamm führte (Bishop *et al.*, 1985). Die Balb/C Maus wurde im Jahre 1923 von McDowell gezüchtet und durch Kreuzungen über mehrere Generationen als Inzuchtstamm etabliert.

In dieser Arbeit wurde die C57/Bl.6 Maus für die Analysen zur *in-vivo* Funktion von E2F6 verwendet. Die Balb/C Maus diente als Vergleichsstamm, um eine eventuelle Beeinflussung des Phänotyps E2F6 defizienter Mäuse durch einen stammspezifischen genetischen Hintergrund auszuschließen.

2.1.2 Bakterienstämme

DH5 α *E.coli* F ϕ 80dlacZ Δ M15 Δ (lacZYAaegF)U169 *deoR* *recA1*
endA1 *hsdR17* (r_K^i, m_K^+)*phoAsupE44* *λ -thi-1* *gyr A96* *relA1*

BL21Lys(De3) *E. coli* B F *dcm* *ompT* *hsdS*($r_B^- m_B^-$)*gal* λ (DE3)

2.1.3 Säugerzellen

Primäre murine embryonale Fibroblasten

Diese Zellen wurden aus 13.5 Tage alten Mausembryonen (C57/Bl.6 Mäuse) präpariert und anschließend kultiviert (siehe 3.2.1). Da es sich um primäre Zellen handelt, konnten diese Zellen nur für wenige Passagen kultiviert werden.

Phoenix^{eco}

Humane Zelllinie, die zur Produktion von rekombinanten, ekotrophen Retroviren etabliert wurde.

HeLa

Humane Zervixkarzinom-Zelllinie

2.2 Medien**2.2.1 Medien für die Bakterienkultur****LB-Agar**

Luria Bertani Agar (Roth)

40g Pulver auf 1l H₂O**LB-Medium**

Luria Bertani Medium (Roth)

25g Pulver auf 1l H₂O*Autoklavieren***2.2.2 Medien für die Zellkultur**

Medien für die Zellkultur wurden von der Firma BioWhittaker (Verviers, Belgien), Fötale Kälberserum (*Fetal Calf Serum, FCS*) von der Firma Gibco (Karlsruhe) und *Serum Supreme* von der Firma Cambrex bezogen.

DMEM Vollmedium

Dulbecco's modified Eagle's Medium (4,5g/l Glukose mit Glutamin), versetzt mit 10% *FCS* und 1% Penicillin/Streptomycin (10.000U/ml // 10mg/ml, Cambrex).

DMEM Hungermedium

Dulbecco's modified Eagle's Medium (4,5g/l Glukose mit Glutamin), versetzt mit 0.1% *FCS* und 1% Penicillin/Streptomycin (10.000U/ml // 10mg/ml, Cambrex).

DMEM Vollmedium für Phoenix^{eco} Helferzellen

Dulbecco's modified Eagle's Medium (4,5g/l Glukose mit Glutamin), versetzt mit 10% *Serum Supreme* und 1% Penicillin/Streptomycin (10.000U/ml // 10mg/ml Cambrex).

Einfriermedium

DMEM Vollmedium + 10% DMSO (v/v; Merck), steril filtriert

2.3 Oligonukleotide

- Oligonukleotide zur Genotypisierung von Mäusen bzw. Embryonen

Bezeichnung	Gen	Sequenz (5'→3' Orientierung)
SG 130	E2F6-I	AGGCCACTTGTGTAGCGCCAAG
SG 114	E2F6-II	AAGGGCAAACCCACACAGATG
SG 113	E2F6-III	GGCTTGTCACCACCAACTGCTG

- Oligonukleotide zur Expressionsanalysen mit RT-PCR

Bezeichnung	Gen	Sequenz (5'→3' Orientierung)
SG 106	5' Aktin	TGTGATGGTGGGAATGGGTCAG
SG 107	3' Aktin	TTTGATGTCACGCACGATTTCC
SG 252	5' Brca1	GAGGAGAGCACCAGCGTATC
SG 253	3' Brca1	GCAAATGACTGACGCTTTGA
SG 112	5' E2f6	CCCCAGGGGCAGATCTGACGAGATCC
SG 122	3' E2f6	CGGACGGCGCGGAGAC
SG 254	5' HP1 α	AGCCGACAGCTCTTCTTCAG
SG 255	3' HP1 α	CCGAGCGATATCATTGCTTT
SG 256	5' RbAp48	AAGGTGGTGGATGCAAAGAC
SG 257	3' RbAp48	ACGATCGGTACCACTGGAAG
SG 270	5' Smc112	GCATGGATTGCTTGGAAAGAT
SG 271	3' Smc112	AGGCTACAACAATGGCAACC
SG 272	5' Stag3	AGAGTCTGACGGCCAAAGAA
SG 273	3' Stag3	GCTTCTGGCAAAGTCCACTC
SG 315	5' XM_196054	CCTGCACTCCCAATCAGTTT
SG 316	3' XM_196054	TTGAAAGCTTGGCTTTTCTG
SG 96	5' p16 ^{Ink4a}	GGGGATCCGTCACACGACTGGGCGATTGGGCG
SG 97	3' p16 ^{Ink4a}	GGGAATTCTACGACCGAAAGAGTTCGGGGCCG
SG 98	5' p19 ^{Arf}	GGGGATCCATGGGTTCGAGGTTCTTGGTCAC
SG 99	3' p19 ^{Arf}	GGGAATTCAAGATCCTCTCTAGCCTCAACAAC

- **Oligonukleotide für Chromatinimmunpräzipitationen**

Bezeichnung	Promotor	Sequenz (5' ->3' Orientierung)
SG 286	5' Smc112	CCCACAAAAGTTTGAGAGCAAGTC
SG 287	3' Smc112	ATGATGCAGGTGAACCTCTTGAA
SG 296	5' Stag3	AGGACTGCACAGCTACATGC
SG 297	3' Stag3	GGCTGAAGAAAGGTCACCAC
SG 383	5' Stag3 4kb	CAGCCAGAGACAGTGCTAACC
SG 384	3' Stag3 4kb	ATGGAATCCGATGCACTCTT
SH 77	5' aP2	CAAAGAGCCATTAAGACTAAGAATCTC
SH 78	3' aP2	ATTTGCCTCATTGTGGAGGA

2.4 Plasmide

- **Expressionsplasmide in Prokaryonten**

Bezeichnung	Beschreibung	Herkunft
pRSETA mE2F6	IPTG induzierbares Expressionsplasmid mE2F6 BamHI-EcoRI aus pcDNA3mE2F6	SG

- **Expressionsplasmide in eukaryontischen Zellen**

Bezeichnung	Beschreibung	Herkunft
pcDNA3	pcDNA3 Expressionsvektor	Invitrogen
pcDNA3 mE2F6	mE2F6 im pcDNA3 Vektor	T. Dahme
pCMV β -Gal	β -Galaktosidase Expressionsvektor	SG
pGL2- Basic	Luziferase Reporterplasmid	Promega
pGL2 Smc112 -150/+50	Smc112 Promotorfr. im pGL2-Pl.	A. Rubeck
pGL2 Smc112 Mut-A	Smc112 Promotorfr. mit mutierter E2F-A Sequenz im pGL2-Plasmid	A. Rubeck
pGL2 Smc112 Mut-B	Smc112 Promotorfr. mit mutierter E2F-B Sequenz im pGL2-Plasmid	A. Rubeck

- **Plasmide zur Generierung von RNA Sonden für in-situ Hybridisierungen**

Bezeichnung	Beschreibung	Herkunft
pCDNA3 E2F6	mE2F6 im pcDNA3 Vektor	SG
pT3T7lac Hox C9	638bp 3'UTR + 288bp Exon I EcoRI-XhoI Fragment des Hox C9 Gens im pT3T7lac Plasmid	SG
pSAFYre Hox C10	Plasmid war nicht näher beschrieben	SG
pBluescriptIIS+ Hox B3	700bp BamHI-HindIII Fragment von Hox B3 im pBluescriptIIS+ Vektor	SG
pT3T7lac Hox C11	304bp EcoRI-XbaI Fragment der Hox C11 Homeodomäne im pT3T7lac Plasmid	SG
Hox D9	Plasmid war nicht näher beschrieben	SG
pBluescriptIIS+Hox B8	732bp Fragment von Hox B8 im pBluescriptIIS Vektor	SG
pBluescriptIIS+HoxC8	729bp Fragment von Hox C8 im pBluescriptIIS Vektor	SG

- **Plasmide zur Infektion von murinen embryonalen Fibroblasten**

Bezeichnung	Beschreibung	Herkunft
pBabePuro	retrovirales Expressionsplasmid	H. Land
pBabemE2F6	pBabe Expressionsvektor mit der mE2F6cDNA	SG
pBabeRasV12	pBabe Expressionsvektor mit einer RasV12 Mutante	M. Eilers

2.5 Antikörper

2.5.1 Antikörper für immunologische Nachweisverfahren

- primäre Antikörper

Antikörper <i>anti-</i>	Beschreibung	Herkunft
anti-BrdU-FITC	monoklonaler Mausantikörper gegen BrdU, FITC gekoppelt, für <i>FACS</i> -Analysen	Becton Dickinson
Stag3	polyklonaler Kaninchenantikörper gegen murines Stag3 für Western Blots (1:200)	Santa Cruz
E2F6 (Maus)	polyklonaler Kaninchenantikörper gegen murines E2F6 für Western Blots (1:200) und für Immunpräzipitationen	siehe 3.7.9
E2F6 (C10 - Maus)	Affinitätsgereinigtes polyklonales E2F6 Antiserum für Western Blots (1:200) und für Immunpräzipitationen	SG

- sekundäre Antikörper

Antikörper <i>anti-</i>	Beschreibung	Herkunft
Prot.-A HRP	Protein A, Peroxidase gekoppelt	Amersham

2.5.2 Antikörper für Chromatinimmunpräzipitationen

Antikörper <i>anti-</i>	Beschreibung	Menge	Herkunft
E2F6	polyklonal Kaninchen affinitätsgereinigt	20µl	siehe 3.7.9
HP1γ	Monoklonal Maus	2µg/µl	Upstate
H4-Acetyl	polyklonal Kaninchen	2µg/µl	
H3-Acetyl	polyklonal Kaninchen	2-4µg/µl	

H3K9/K27 Dimethyl	polyklonal Kaninchen	2.3µg/µl	Abcam
H3K9/K27 Trimethyl	polyklonal Kaninchen	4.3µg/µl	
H3K9 Monomethyl	polyklonal Kaninchen	2µg/µl	T. Jenuwein IMP, Wien
H3K9 Dimethyl	polyklonal Kaninchen	2µg/µl	
H3K9 Trimethyl	polyklonal Kaninchen	2µg/µl	
H3K27 Monomethyl	polyklonal Kaninchen	4µg/µl	
H3K27 Dimethyl	polyklonal Kaninchen	4µg/µl	
H3K27 Trimethyl	polyklonal Kaninchen	4µg/µl	
Ring1a	polyklonal Kaninchen	2µg/µl	M. Vidal
Ring1b	polyklonal Kaninchen	2µg/µl	
RYBP	polyklonal Kaninchen	2µg/µl	
M33	polyklonal Kaninchen	2µg/µl	

2.6 Chemikalien

Soweit nicht gesondert aufgeführt, wurden Chemikalien in Analysenqualität oder in Qualität für die Molekularbiologie von den Firmen Sigma-Aldrich (München), Merck (Darmstadt) und Applichem (Heidelberg) bezogen.

2.7 Lösungen

2.7.1 allgemeine Puffer und Lösungen

Acrylamidstammlösung

30% (w/v) Acrylamid

0,8% (w/v) N,N'-Methylenbisacrylamid (H₂O)

National Diagnostics; UltraPure

Lagerung lichtgeschützt bei 4° C

<u>Ampicillin</u>	0.1g/ml in ddH ₂ O <i>Steril filtrieren, aliquotieren, -20°C</i>
<u>Blocklösung</u> (Western-Blot)	3% (w/v) Magermilchpulver in TBS-T
<u>Bradford Reagenz</u>	0,01% (w/v) Coomassie Brilliant Blue G-250 4,75% (v/v) Ethanol 10% (v/v) Ortho-Phosphorsäure in ddH ₂ O; <i>filtrieren, lichtgeschützt lagern</i>
<u>Chloramphenicol</u>	40mg/ml in ddH ₂ O <i>Steril filtrieren, aliquotieren, -20°C</i>
<u>Coomassie</u>	250ml Methanol 35ml Eisessig 1g Coomassie Blue R-250 ad 500ml ddH ₂ O <i>lichtgeschützt bei RT lagern</i>
<u>Coomassie Destain</u>	250ml Methanol 35ml Essigsäure ad 500ml ddH ₂ O
<u>Kristallviolett-Lösung (0.1%)</u>	0.1% Kristallviolett (w/v) in 20% Ethanol
<u>DEPC-H₂O</u>	0,1% (v/v) Diethylpyrocarbonat in ddH ₂ O <i>24h 37°C, rühren, autoklavieren</i>
<u>2 mM dNTP Lösung</u>	2mM dATP (alle 100mM; Amersham) 2mM dGTP 2mM dTTP 2mMdCTP in H ₂ O; <i>bei -20°C gelagert</i>

<u>Elektrophoreseprobenpuffer</u>	60ml 0.5M Tris/HCl pH6.8 3ml 0.5m EDTA 2.3g DTT 12g SDS 15g Glycerol 30mg Bromphenolblau ad 100ml ddH ₂ O <i>aliquotieren, bei -20°C lagern</i>
<u>Essigsäurelösung</u>	10% Essigsäure (v/v) in ddH ₂ O
<u>Ethidiumbromid</u>	10mg/ml in ddH ₂ O
<u>FACS Probenpuffer</u>	38mM Natriumazetat in ddH ₂ O
<u>Formalinlösung (10%)</u>	10ml 37% Formaldehyd 90ml ddH ₂ O
<u>IPTG</u>	1M Isopropylthio-β-D-Galaktosidase in ddH ₂ O
<u>10xMOPS Puffer</u>	0.4M MOPS pH7.0 0.1M NaAc 0.01M EDTA in DEPC H ₂ O; <i>im Dunkeln lagern</i>
<u>Naßblotpuffer</u>	25mM Tris 150mM Glycin 15% Methanol in ddH ₂ O

<u>PBS</u>	137mM NaCl 3mM KCl 6,4mM Na ₂ HPO ₄ 1,5mM KH ₂ PO ₄ pH 7,4 mit HCl, <i>autoklavieren</i>
<u>Phenol/Chloroform Lösung</u>	Phenol:Chloroform (1:1)
<u>Ponceau Lösung</u>	0.1% Ponceau S 5% Essigsäure
<u>Propidium Iodid</u>	1mg/ml Propidiumiodid in ddH ₂ O
<u>RNA Probenpuffer</u>	1µl 10 x MOPS 5µl deion. Formamid 1µl Ethidiumbromid (400 µg/ml) 2µl Formaldehyde
<u>RNA Ladepuffer</u>	0.2 % Xylencyanol 0.2 % Bromphenolblau 10 mM EDTA 50 % Glycerol
<u>10x SDS-Laufpuffer:</u>	0,25M Tris pH 8,3 1,92M Glycin 1% (w/v) SDS in ddH ₂ O
<u>50x TAE:</u>	2M Tris Base 250mM Eisessig 50mM EDTA, pH 8,0 in ddH ₂ O
<u>Trizol™ Lösung</u>	Trizol™ Gebrauchslösung (Invitrogen)

<u>Tail-Verdaupuffer</u>	100mM Tris/HCL pH 8.5 5mM EDTA 0.2% SDS (w/v) 200mM NaCl in ddH ₂ O
<u>1x TBE:</u>	89mM Tris-Base 89mM Borsäure 2mM EDTA in ddH ₂ O
<u>TE:</u>	10mM Tris/HCl, pH 8.0 1mM EDTA in ddH ₂ O; autoklavieren
<u>20x TBS</u>	1M Tris/HCl pH7.4 3M NaCl in ddH ₂ O
<u>TNN Lysispuffer</u>	50mM Tris/HCL pH7.5 120mM NaCl 5mM EDTA 0.5% NP-40 10mM Na ₄ P ₂ O ₇ 2mM Na ₃ VO ₄ 100mM NaF in ddH ₂ O <i>vor Verwendung Proteinaseinhibitoren zugeben:</i> 1mM DTT, 10µg/ml Aprotinin, 10µg/ml Leupeptin, 10µg/ml PMSF

2.7.2 Spezielle Lösungen

2.7.2.1 Lösungen für die Histologie und Knochenfärbungen

Alcian-Blau Färbelösung
(Knorpelfärbung)

Alcian Blue 8GX	15 mg
95% Ethanol	80 ml
Eisessig	20 ml

mit ddH₂O auf 100ml auffüllen

Alizarin-Rot Färbelösung
(Knochenfärbung);

Alizarin Red	50 mg
2% KOH	1000 ml

Carnoy Fixierlösung

60% Ethanol	(v/v)
30% Chloroform	(v/v)
10% Essigsäure	(v/v)

vor Gebrauch frisch ansetzen

Eosin Lösung
(HE-Färbung)

1g Eosin in 1l ddH₂O. lösen (gelblich)
1 Tropfen Essigsäure auf 100 ml Eosin zugeben

Hämatoxylin Lösung:

1g Hämatoxylin in 1l ddH₂O lösen, 0,2g Natriumjodat (NaJO₃) und 50g chem. Kalialaun am besten ü.N. lösen (es dürfen keine Kristalle mehr vorhanden sein, blau-violetter Farbton), 50g Chloralhydrat und 1g kristallisierte Zitronensäure hinzufügen, wobei die Lösung zu einem rot-violetten Farbton umschlägt.
filtrieren, bei RT lagern

2.7.2.2 Lösungen für *in-situ* Hybridisierungen

Antikörperpuffer

10% Ziegen Serum (v/v) (*Hitze inaktiviert*)
1% Block Lösung in PBS-T (Boehringer)
Lösung bei 65°C erhitzen bis sich Blockpulver gelöst hat, filtrieren (0.45µm Filter)

API Puffer

100mM Tris pH 9.5
100mM NaCl
50mM MgCl₂
in ddH₂O

IOx Block Puffer

10% Boehringer Block
in 1x Maleinsäurepuffer pH 7.2 (w/v)

BM Purple Färbelösung

BM Purple AP Substrat Färbelösung, gebrauchsfertig (Roche)

Glycinlösung

2mg/ml in PBS-T

Hybridisierungslösung

5g Boehringer Block
250ml Formamid
125ml 20X SSC, pH 7.0
Erhitzen auf 65°C für 1 Stunde, wenn gelöst:
60ml DEPC-H₂O
50ml 10mg/ml Torula RNA (*diese 2 min bei 65°C zum Aufklaren erhitzen*)
1ml 50mg/ml Heparin
2.5ml 20% Tween-20
5ml 10% CHAPS
5 ml 0.5 M EDTA
ad 500ml DEPC H₂O
mit 0.45µm Filtern filtrieren, aliquotieren, bei 20°C lagern

Paraformaldehydlösung 4% Paraformaldehyd in PBS (w/v)
(Fixierlösung für Embryonen) *Erhitzen und kurz bei 60° rühren, -20°C*

PBS-T PBS + 0.1% Tween-20 (v/v)

20xSSC Lösung 3M NaCl
0,3M Na-Citrat; pH 7,0
in ddH₂O; *autoklavieren*

2.7.2.3 Lösungen für Luziferase Reporterassays

ATP-Puffer 5mM Glycylglycin, pH 7,8
2mM ATP
10mM MgSO₄
in ddH₂O

LacZ-Puffer: 60mM Na₂HPO₄, pH 8,0
1mM MgSO₄
10mM KCl
in ddH₂O

Luziferin-Lösung 1mM D-Luziferin (Sigma)
25mM Glycylglycin, pH 7,8
im Verhältnis 1: 4,5 (v/v)
in ddH₂O

β-Mercaptoethanol β-Mercaptoethanol Gebrauchslösung

ONPG 6mg/ml in in ddH₂O

5x Passiv- Lysepuffer Lysispuffer Gebrauchslösung (Promega)

2.7.2.4 Lösungen für Chromatinimmunpräzipitationen

<u>IP-Elutionspuffer</u>	50mM Tris/HCl pH 8.0 1% SDS 10mM EDTA in ddH ₂ O
<u>IP-Verdünnungspuffer</u>	0.01%SDS 1.1% Triton 1.2mM EDTA 16.7mM Tris/HCl pH 8.2 167mM 5M NaCl in ddH ₂ O
<u>IP-Waschpuffer</u>	0.25M LiCl 0.5% NP-40 0.5% DOC 1mM EDTA 10mM Tris/HCl pH 8.0 in ddH ₂ O
<u>Kernlysepuffer</u>	50mM Tris/HCL pH8.1 10mM EDTA 1% SDS in ddH ₂ O <i>Proteinaseinhibitoren zugeben</i>
<u>Lysepuffer</u>	5mM PIPES pH 8.0 85mM KCl 0.5% NP-40 in ddH ₂ O <i>Proteinaseinhibitoren zugeben</i>

2.7.2.5 Lösungen zur präparativen Aufreinigung von His-mE2F6**Lysepuffer A**

6M GuHCl
0.1M Na-Phosphat
0.01M Tris/HCl pH8.0
in ddH₂O

Puffer B

8M Harnstoff
0.1M Na-Phosphat
0.01M Tris/HCl pH 8.0
in ddH₂O

Puffer C

8M Harnstoff
0.1M Na-Phosphat
0.01 M TRIS/HCL pH 6.3
in ddH₂O

Elutionspuffer

Puffer-C + 50mM Imidazol

2.7.2.6 Lösungen für die Zellkultur**5'Aza Lösung**

10mM 5'Aza-2'Deoxyctidin in ddH₂O
Steril filtrieren, -20°C

BrdU Lösung

10mg/ml Bromodeoxyuridin in PBS
Steril filtrieren, -20°C

DMSO

Dimethylsulfoxid (100%)

2xHBS Transfektionslösung

280mM NaCl
1.5mM Na₂HPO₄
50mM HEPES-KOH, pH 7.05

<u>Lipofectamin 2000TM</u>	Transfektionsgebrauchslösung (Invitrogen)
<u>OptiMem1TM</u>	Optimem Gebrauchslösung mit Glutamax-I (Gibco)
<u>Polybrene</u>	Hexadimethrine Bromide, 4mg/ml in ddH ₂ O <i>steril filtrieren, -20°C</i>
<u>Puromycin</u>	20mg/ml in ddH ₂ O <i>Steril filtrieren, -20°C</i>
<u>Trypsin/EDTA</u> (Zellkultur)	1x Trypsin/EDTA Lösung (Invitrogen) gebrauchsfertig
<u>Trypsin/EDTA (0.25%)</u> (Fibroblastenpräparation)	0.25% Trypsin/ EDTA Lösung (Invitrogen) gebrauchsfertig
<u>TSA</u>	1mg/ml Trichostatin A in DMSO <i>Steril filtrieren, -20°C</i>
2.7.3 Standards und Enzyme	
2.7.3.1 Standards	
<u>Proteingel-Marker</u>	SDS 7B Marker (Sigma) gelöst in 0.5ml 8M Urea und 0.5ml 1xESB; <i>aliquotieren, -20°C</i>
<u>DNA-Marker</u>	1kb DNA Marker (Invitrogen) in 1x DNA Ladepuffer, -20°C

2.7.3.2 sequenzspezifische Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen wurden von den Firmen Gibco und NEB bezogen und die Verwendung zur sequenzspezifischen, enzymatischen Hydrolyse von DNA erfolgte nach den vom Hersteller angegebenen Puffer- und Inkubationsbedingungen

2.7.3.3 Protein-verdauende Enzyme

Proteinase K 10mg/ml ProteinaseK (Sigma) in ddH₂O

2.7.3.4 RNA und DNA verdauende Enzyme

RNase-freie DNase 1500 Kunitz-Units (Quiagene)
(DNase Behandlung auf Säulen)

RNase -freie DNase RQ-1 DNase; 1U/μl (Promega)
(DNase Behandlung gelöster RNA)

RNase A 10mg/ml RNase A in:
10mM Tris pH 7,4
15mM NaCl
15 min bei 100°C (DNase Inaktivierung)

RNasin Lösung 10.000 U/ml (Promega)

2.7.3.5 Polymerasen und Reverse Transkriptasen

Taq-Polymerase	Invitrogen (1U/μl)
CyScript reverse Ttranskriptase	Amersham (100U/μl)
T7-Polymerase	Invitrogen (50U/μl)
T3-Polymerase	Roche (20U/μl)

Sp6 Polymerase	Roche (20U/ μ l)
MMLV-RT	Invitrogen (200U/ μ l)

2.8 **KITs**

In dieser Arbeit wurden die folgenden kommerziell erhältlichen *Kits* verwendet.

Kit	Verwendung	Hersteller
CyScribe Post-Labeling Kit TM	cDNA Probenmarkierung	Amersham
DIG RNA Labeling Mix TM	RNA Markierung mit DIG-dUTP	Roche
DIG Detection Kit TM	Detektion DIG-dUTP -RNA	Roche
DNase (on columns)	DNase Verdau auf RNAeasy Säulen	Quiagene
DNA Maxi-Präparationskit TM	präparative DNA Aufreinigung	Genomed
ECL W.- Blot Detection TM	Entwicklerlösung	Amersham
PCR Purification Kit TM	Aufreinigung von PCR Produkten	
RNAeasy TM	Aufreinigung von Gesamt-RNA	Quiagene
RQ-1 DNase System TM	DNase Verdau	Promega
M-ML-V-RT Kit	cDNA Synthese mit reverser Transkription	Invitrogen
Transkriptionskit	<i>in-vitro</i> Transkription	Roche

2.9 **Geräte + Materialien**

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die folgenden Geräte und Werkzeuge verwendet.

Gerät	Typ	Hersteller
Autoklaven		Heraeus
Bakterieninkubatoren		Heraeus
Binoukular	Leica MZ125	Leica
Blotkammern		BioRad
CO ₂ -Inkubatoren	AutoZero CO ₂	Heraeus
Einfrierröhrchen	2ml	Nunc
ELISA – Mikrotiter Platten		Greiner
ELISA Reader	Spektra Max 340	MWG

Eppendorf-Reaktionsgefäße	1.5ml 2ml	Eppendorf
Falkon Röhrchen	15ml 50ml	Sarstedt
FACS Probenröhrchen		Becton Dickinson
FACSCalibur Durchflußzytometer		Becton Dickinson
Filmentwickler		Kodak
Gelelektrophorese-Apparatur		Biorad
Geltrockner		Savant
Hamilton Kanüle	50µl	Hamilton
Heizblöcke	HBT 130	HLC
Luminometer	Lumat LB 9507	Berthold
Microarray Scanner	GMS 418	Affymetrix
Mikroskop		Olympus CK2
Pinzetten	verschiedene Größen	Wironit
Pipetten	Pipetman	Gilson
PVDF	0.45µm Porengröße	Millipore
Präzisionswaage		Kern
Quarzküvette	104 QS	Hellma
Rasierklingen		Wironit
Rotor Stator Homogenisator	Ultra Thurax	IKA Labortechnik
Scheren	Größe	Wironit
Schüttelinkubatoren	Model G25	New Brunswick Co.INC
Skalpelle		Feather
Sonifiziergeräte		Branson
Spannungsgeräte	PowerVac300	BioRad
SpeedVac	DNA 110	Sovant
Spektrophotometer		Pharmacia Biotech
Sterilbank	LaminAir HA 244865	Heraeus
Sterilfilter	FP30/0.45µm	Schleicher+Schüll
T1 Thermocycler		Biometra
Tuchklemmen		Wironit
Whatman-Filterpapiere	Gel-Blotting Papier	Schleicher und Schuell
Wasserbäder	SW21C	Julabo
Zählkammer	Neubauer improved	Assistent, Germany
Zellkulturschalen	15cm, 10cm, 6cm 24 Loch Platten	(Nunc Brand Products)
Zellschaber		Greiner
Zentrifugen	RC-5B Labofuge GL Mikrozentrifuge 5415D Mikrozentrifuge 5417R Megafuge 1.OR	Sorvall Heraeus Eppendorf Eppendorf Heraeus

3 Methoden

3.1 Haltung, Zucht und Arbeit mit Mäusen

3.1.1 Der Umgang mit Mäusen

Beim Umgang mit Mäusen wurde auf eine artgerechte Tierhaltung geachtet. Dies bedeutet den Schutz der Tiere vor Infektionen durch Tragen von Einmalkitteln und Handschuhen. Eingriffe am lebenden Tier wie Blutentnahmen und Narkotisierung erfolgten durch dafür ausgebildetes Fachpersonal. Es wurden nicht mehr als vier Tiere in einem kleinen Käfig (22cmx16cm) gehalten. Alle Arbeiten wurden im Einklang mit dem bundesdeutschen Tierschutzgesetz durchgeführt.

3.1.2 Zucht

Mäuse die für die Zucht eingesetzt wurden waren mindestens 8-10 Wochen alt. Die Männchen wurden bei der Verpaarung für mindestens 10 Tage im Käfig des Weibchens gelassen, da der Zyklus der weiblichen C57/Bl.6 Maus alle 4-5 Tage für 13 Stunden stattfindet und somit die Wahrscheinlichkeit einer erfolgreichen Befruchtung erhöht war.

Sollte der genaue Zeitpunkt der Befruchtung festgestellt werden, erfolgte eine visuelle *Plug*-Kontrolle. Nach der Begattung hinterlassen die Männchen einen Schleimpropf (*Plug*) in der Vagina des Weibchens, der über mehrere Stunden bestehen bleibt. Die Begattung findet durch den in den Standardtierställen eingestellten Lichtrythmus in der Regel nachts statt, so dass am nächsten Morgen die *Plug*-Kontrolle erfolgte. Wurde ein *Plug* erkannt zählt dieser Tag als E0.5 der Embryonalentwicklung und das Männchen wurde abgesetzt.

3.1.3 Röntgenaufnahmen von Mäusen

Zur Darstellung der Skelette von E2F6 defizienten Mäusen und Kontrolltieren wurden diese narkotisiert. Röntgenaufnahmen wurden mit einem Mammographiegerät der Frauenklinik, Philipps-Universität Marburg, durchgeführt. Die hierzu verwendeten Mäuse wurden nicht weiter für die Zucht verwendet.

3.1.4 Präparation von 9.5 Tage alten Embryonen

Alle Materialien zur Präparation wurden vor Gebrauch für 1-2 Stunden in 0.1N NaOH Lösung inkubiert (Scheren, Pinzetten, Klemmen, Glasgefäße) mit 70% Ethanol (v/v) gereinigt, mit DEPC-H₂O gespült und anschließend autoklaviert.

Zur Präparation von 9.5 Tage alten Mausembryonen wurden E2f6^{-/-} Weibchen mit E2f6^{-/-} Männchen verpaart, um ausschließlich Embryonen mit einem E2f6^{-/-} Genotyp zu erhalten. Entsprechend wurde mit E2f6^{+/+} Mäusen verfahren. Die Kontrolle der Befruchtung erfolgte wie 3.1.2 beschrieben.

Nach 9.5 Tagen wurde das Weibchen durch zervikale Dislokation getötet, das Peritoneum sorgfältig mit 70% Ethanol (v/v) desinfiziert und anschließend mit einer Schere eröffnet. Der Uterus mit den Embryonen wurde aus der Maus präpariert, in eine 15 cm Zellkulturschale überführt und gründlich mit sterilem PBS gespült.

Die Embryonen wurden in eiskaltem PBS aus dem Uterus freipräpariert und in 4% Paraformaldehyd ü.N. bei 4°C fixiert. Am nächsten Tag wurden die Embryonen 2x mit PBS-T gewaschen, in einer Methanolreihe entwässert (25%, 50%, 75% und 100% Methanol in DEPC-H₂O (v/v)) und bei -20°C gelagert.

3.2 Zellbiologische Methoden

3.2.1 Präparation von Maus Embryonalen Fibroblasten

Um primäre embryonale Fibroblasten aus der Maus zu gewinnen, wurden E2f6 heterozygote Mäuse (E2f6^{+/-}) verpaart, eine *Plug*-Kontrolle wie in 3.1.2 beschrieben durchgeführt und der Uterus präpariert (siehe 3.1.4). Anschließend wurde mit einer Feinpinzette die Embryonen vorsichtig aus dem Uterus unter Bewahrung der embryonalen Hüllen herauspräpariert und in eine 6cm Schale mit sterilem PBS überführt. Die Plazenta und embryonalen Häute wurden entfernt und der Embryo in eine frische 6cm Schale mit sterilem PBS gelegt. Der Kopf des Embryos wurde mit einer Pinzette abgetrennt, in ein Eppendorf Reaktionsgefäß überführt und mit 500µl *Tail*-Verdauungspuffer überschichtet. Die deutlich sichtbaren rötlich gefärbten Herz- und Leberstrukturen wurden mit einer Feinpinzette aus dem Rumpf des Embryos entfernt, dieser in eine 10cm Schale überführt und mit 2ml Trypsin (0.25%) überschichtet. Mit zwei desinfizierten Rasierklingen wurde das embryonale Gewebe homogenisiert, für 5 min bei 37°C inkubiert, anschließend erneut mit frischen 2ml Trypsinlösung (0.25%) versetzt und weitere 5min inkubiert. Durch Zugabe von fri-

schem Vollmedium wurde das Trypsin inaktiviert, die Zellsuspension in 15ml Röhren überführt, zentrifugiert (1200rpm, 5min, 4°C) und das Zellpellet in 10ml frischem Medium resuspendiert. Die Fibroblasten wurden in 10cm Schalen ausgesät (Passage-0; P-0), nach 2 Tagen wie in 3.2.2 beschrieben 1:4 passagiert (Passage-1; P-1) und nach weiteren 2 Tagen wie in 3.2.5 beschrieben eingefroren (Passage-2; P-2). Die Fibroblasten die aus einem Embryo präpariert und kultiviert wurden, werden im Folgenden als ein Fibroblastenklon bezeichnet.

3.2.2 Passagieren von Zellen

Um einen Wachstumsstopp durch Kontakthemmung zu vermeiden wurden die Zellen in Abhängigkeit von ihrem Wachstumsverhalten verdünnt und neu ausplattiert.

Sofern nicht anders angegeben wurden die murinen primären embryonalen Fibroblasten jeden 2. Tag im Verhältnis 1:4, Phoenix^{eco} Helferzellen und humane HeLa Tumorzellen alle 2-3 Tage im Verhältnis 1:10 bis 1:12 neu ausplattiert. Zum Ablösen der Zellen wurde der Zellüberstand abgesaugt, die Zellen mit sterilem 1x PBS gewaschen, mit 1ml Trypsin/EDTA versetzt und bei 37°C für 5 Minuten inkubiert. Nach mikroskopischer Kontrolle, ob sich die Zellen vollständig gelöst hatten, wurden die Zellen in frischem Medium resuspendiert und je nach gewünschtem Verdünnungsgrad auf neue Zellkulturschalen ausplattiert.

3.2.3 Passage von Zellen nach dem 3T3 Protokoll

Primäre Zellen, die in Kultur genommen werden, können nur eine begrenzte Anzahl an Zellzyklen durchlaufen. Anschließend induzieren sie charakteristischerweise eine replikative Seneszenz und arretieren im Zellzyklus. Zur Untersuchung der replikativen Seneszenz in E2f6^{-/-} und in Kontrollfibroblasten wurden je Genotyp 3 Fibroblastenklone ausgesät (P2), ü.N. kultiviert und am nächsten Tag jeweils 5x6cm Schale mit 3×10^5 Zellen ausgesät. Nach 3 Tagen wurden die Zellen in der gleichen Dichte wie zuvor passagiert. Durch die Bestimmung der absoluten Zellzahl bei jeder Passage konnte das Wachstum der Zellen in Abhängigkeit von der Zeit bestimmt, dokumentiert und dargestellt werden.

3.2.4 Synchronisierung von Zellen

Kultivierte Zellen zeigen ein asynchrones Wachstum, d.h., die Zellen befinden sich in unterschiedlichen Phasen des Zellzyklus. Eine Möglichkeit zu Synchronisation der Zellzyklusphasen wachsender Zellen bildet das Hungern der Zellen in serumarmen Medium für mehrere Tage und anschließender Inkubation in DMEM Vollmedium. Hierzu wurden embryonale Fibroblasten nach der zweiten Passage (P-2) mit DMEM-Hungermedium (0.1% FCS// 1%P/S;) versetzt und für ca. 60h-72h inkubiert. Primäre Zellen arretieren unter diesen Kulturbedingungen im Zellzyklus. Eine synchrone Rückkehr der Zellen in den Zellzyklus wurde durch Zugabe von DMEM-Vollmedium erreicht.

3.2.5 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Das Einfrieren von eukaryotischen Zellen ermöglicht die Lagerung der Zellen über einen langen Zeitraum. Durch Verwendung von DMSO (**D**imethylsulfoxid) wird dabei die Bildung von Eiskristallen verhindert. Die Zellen wurden trypsiniert, mit dem jeweiligen Medium auf 10ml aufgefüllt, in ein 15ml Falcon-Röhrchen überführt und durch Zentrifugation (1200rpm, 5min, RT) präzipitiert. Das Zellpellet wurde in 1,5ml Einfriermedium resuspendiert und in Einfriereröhrchen überführt. Das Einfrieren der Zellen erfolgte schrittweise durch Inkubation für 5min auf Eis, und für mehrere Tage bei -80°C . Die langfristige Lagerung erfolgte in Flüssigstickstoff.

Während beim Einfriervorgang die Zellen möglichst langsam und schrittweise heruntergekühlt werden sollten, ist beim Auftauen zügig zu arbeiten, um Zellschädigungen zu verhindern. Die Zellen wurden im 37°C Wasserbad aufgetaut, die Zellsuspension in ein mit 10ml Vollmedium gefülltes 15ml Falcon-Röhrchen überführt, zentrifugiert (1200rpm, 5min, RT), das Zellpellet in frischen 10ml Vollmedium resuspendiert und auf einer 10cm Zellkulturschale ausplattiert.

3.2.6 Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzahl wurde mit Hilfe einer modifizierten Neubauer-Zählkammer unter Verwendung folgender Formel ermittelt:

$$\text{Zellen [ml}^{-1}\text{]} = (\text{Zellzahl/Zahl der gezählten Großquadrate}) \times 10.000$$

3.2.7 Wachstumskurven von Maus embryonalen Fibroblasten

Zur Untersuchung und zum Vergleich der Proliferation von E2F6^{-/-} mit E2f6^{+/+} Fibroblasten wurden diese aufgetaut (P-2) und nach 24h Inkubation in einer Dichte von 1×10^4 Zellen in einer 24 Loch Platte ausgesät (P-3). Um die Varianz der Proliferation primärer Zellen zu berücksichtigen, wurden von jedem Genotyp jeweils drei verschiedene Fibroblastenklone in Triplikaten ausgesät. Nach 25h, 50h, 75h, 100h und 125h wurden die Zellen mit PBS gewaschen, in 10% Formalin-Lösung für 10min bei RT fixiert und danach erneut mit PBS gewaschen. Die Färbung der Zellen erfolgte mit 0.1% Kristallviolettlösung für 30 min bei RT. Nach gründlichem Waschen mit Leitungswasser wurde der Farbstoff mit 500µl 10% Essigsäurelösung extrahiert, jeweils 100µl Extrakt auf eine ELISA Platte überführt und die optische Dichte (OD) bei 590nm mit einem ELISA Reader bestimmt. Als Referenz wurden Zellen 6h nach Ausplattierung fixiert und gefärbt. Zur Auswertung wurde die OD eines Fibroblastenkons zu einem definierten Zeitpunkt ins Verhältnis zur Referenz gesetzt, gemittelt und zusammen mit der Standardabweichung graphisch dargestellt.

3.2.8 Durchflußzytometrische Bestimmung der Zellzyklusverteilung

Zur Bestimmung der Zellzyklusverteilung von Fibroblasten mit einem Durchflußzytometer wurden Zellen in 10cm Schalen ausgesät (P-2) und bis zu einer subkonfluenten Dichte von ca. 70% kultiviert.

Zur Präparation der Zellen für die durchflußzytometrische Messung wurden die Fibroblasten gewaschen, trypsiniert, zentrifugiert (1200rpm, 5min, 4°C) und in kaltem PBS gewaschen. Anschließend wurde zur Fixierung der pelletierten Zellen (1200rpm, 5min, 4°C) tröpfchenweise 1ml eiskalter 70% Ethanol (v/v) zugegeben und die Zellen bei -20°C ü.N. inkubiert. Die Ethanolfixierung erzeugt eine poröse Membranstruktur, die eine Färbung der DNA mit interkalierenden Farbstoffen ermöglicht. Hierzu wurden die fixierten Fibroblasten erneut zentrifugiert (1200rpm, 5min, 4°C), mit kaltem PBS gewaschen und in 500µl *FACS* Probenpuffer aufgenommen. Die Zellsuspension wurde mit 25µl RNase A versetzt und 30min bei 37°C inkubiert. Abschließend wurde die DNA durch Zugabe von 15µl Propidiumiodid gefärbt und die Fluoreszenz mit einem *FACSCalibur* Durchflußzytometer bestimmt.

Zellen mit einem einfachen DNA Gehalt (*IN*; *G1/G0* Phase) zeigen dabei eine schwächere Fluoreszenzemission als Zellen, deren DNA Gehalt sich nach der Replikationsphase ver-

doppelt hat (2N, G2/M Phase). Durch die Zuordnung einzelner Zellen anhand ihrer relativen Fluoreszenzemission in die *G1* oder *G2* Phase bzw. die intermediäre *S*-Phase kann die absolute Zellzahl von Zellen in einer der Zellzyklusphasen quantifiziert und in einem Histogramm dargestellt werden. Die Auswertung erfolgte entweder manuell unter Verwendung der CellQuestPro SoftwareTM oder mit dem Auswertungsprogramm ModFitTM (Version 3.0).

3.2.9 Kinetik zum Wiedereintritt in den Zellzyklus

Um den Wiedereintritt von Zellen in die Replikationsphase (*S*-Phase) zu bestimmen, wurden Fibroblasten wie in 3.2.4 beschrieben durch Serumentzug/ Seruminduktion synchronisiert. An definierten Zeitpunkten nach der Seruminduktion erfolgte die Zugabe von 10µM Bromodeoxyuridin (BrdU), das als membrangängiges Thymidinanalog in die zelluläre DNA während der Replikation inkorporiert wird. Nach 1h Inkubation wurden die Zellen wie in 3.2.8 beschrieben in 70% Ethanol (v/v) ü.N. bei -20°C fixiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen zentrifugiert (1200rpm, 10min, 4°C), und mit 1ml 2M HCL/0.5%Triton X-100 für 30min bei RT permeabilisiert und die DNA denaturiert. Danach wurden die Zellen erneut zentrifugiert (1200rpm, 10min, 4°C), der Überstand entfernt und Säurereste durch Zugabe von 1ml 0.1M Na₂B₄O₇ (pH8.5) neutralisiert. Die Zellen wurden gezählt, ca. 2x10⁶ Zellen in ein Eppendorf Reaktionsgefäß überführt, kurz anzentrifugiert und in 50µl PBS/0.5%Tween-20/1%BSA Lösung resuspendiert. Dazu wurde 20µl anti-BrdU-FITC (Fluoreszein-Iso-Thio-Cyanat) Antikörperlösung gegeben und für 30min bei RT im Dunkeln inkubiert. Die Zellen wurden erneut pelletiert, 2x in 50µl PBS/0.5%Tween-20/1%BSA gewaschen, in 500µl FACS Probenpuffer aufgenommen, RNase A behandelt und mit Propidiumiodid versetzt (siehe 3.2.8).

Durch die Markierung des in die DNA inkorporierten BrdU mit einem FITC gekoppelten Antikörper kann durch die Detektion der FITC Fluoreszenzemission mit einem FACSCalibur Durchflußzytometer ein Maß für den BrdU Gehalt bestimmt werden. Die Intensität der Emission ist wiederum ein Maß für den Anteil der Zellen in der Replikationsphase (*S*-Phase). Auf diese Weise konnte eine Kinetik des Wiedereintritts von synchronisiert proliferierenden E2f6^{-/-} und Kontrollfibroblasten in den Zellzyklus erstellt werden.

3.2.10 Koloniebildungsassay

E2f6^{-/-} und E2f6^{+/+} Fibroblasten wurden nach dem in Abschnitt 3.3.3 beschriebenen Infektionsprotokoll mit einem pBabeRasV12 Plasmid und einem Kontrollplasmid infiziert. Zur Selektion wurden 1×10^4 Zellen/ 10cm Schale ausgesät und mit 1.5µg/ml Puromycin selektioniert. Nach 10 Tagen Inkubation unter Selektionsbedingungen wurden die Zellen wie in Abschnitt 3.2.7 beschrieben in Formalin fixiert, mit Kristallviolett gefärbt und entstandene Zellkolonien dargestellt.

3.2.11 Behandlung von Zellen mit Trichostatin-A (TSA) und 5'Aza - 2'Deoxyctidin (5'Aza)

Die Aktivität von Histondeacetylasen kann durch Trichostatin-A (TSA; C₁₇H₂₂O₃N₂) *in-vitro* und *in-vivo* blockiert werden. Zur Behandlung muriner embryonaler Fibroblasten mit TSA wurde eine Konzentration von 2µM über einen Zeitraum von 16h verwendet.

Zur Blockierung der DNA Methylierung wurde 5'Aza-2'Deoxyctidin (5'Aza) verwendet. Das Cytidinanalog kann durch DNA Methyltransferasen nicht methyliert werden, so dass eine Demethylierung der DNA erreicht wird. Zur Behandlung muriner embryonaler Fibroblasten mit 5'Aza zur Blockierung der DNA CpG Methylierung wurde eine Konzentration von 5µM eingesetzt und das 5'Aza alle 24h frisch zu den Zellen hinzugefügt. Die Behandlungsdauer betrug 72 Stunden.

Zur Kombination der beiden Präparate wurden die Zellen zunächst für 72 Stunden mit 5µM 5'Aza behandelt und in den letzten 16 Stunden mit 2µM TSA versetzt.

3.3 Transfektionen und Infektionen eukaryotischer Zellen

3.3.1 Transiente Lipofectamin Transfektion von Plasmid DNA

Um eine hohe Transfektionseffizienz für Luziferase Reportergerneanalysen zu erzielen, wurden Reporterkonstrukte mit Lipofectamin2000TM Reagenz in primäre embryonale Fibroblasten eingebracht. Hierzu wurden E2f6^{-/-} und Kontrollzellen in einer Dichte von $0,8 \times 10^5$ Zellen je Loch einer 24 Loch Platte ausgesät.

Die DNA-Ansätze (Triplikate) wurden mit 150µl OptiMem/Glutamax-1 aufgefüllt. Je Triplikat wurden 10µl Lipofectamin2000TM mit 150µl OptiMem/Glutamax-1TM vermischt und 5 Minuten inkubiert.

Zu jedem DNA Ansatz wurde 150µl des Lipofectamin2000TM -OptiMem Gemisches zugefügt und anschließend 20 Minuten inkubiert. Von diesem Cocktail wurden anschließend 100µl je Loch der 24 Loch Platte gegeben und für 48h inkubiert.

3.3.2 Transfektion durch Kalziumphosphatpräzipitation

Eine Methode zur Einschleusung von Fremdgenen in kultivierte Zellen bildet der Gentransfer mit Kalziumphosphatpräzipitaten. Die DNA wird dabei mit einer Kalziumlösung vermischt und in eine Phosphatlösung überführt. Es bilden sich Kalziumphosphatpräzipitate, die mikroskopisch erkennbar sind. Da die DNA Phosphatgruppen enthält, fällt diese mit aus. Die Präzipitate werden vermutlich endozytotisch von den Zellen aufgenommen.

Einen Tag vor der Transfektion wurden je nach Zelltyp $5-10 \times 10^5$ Zellen auf 10cm Platten ausplattiert. Die zu transfizierende DNA wurde mit H₂O auf ein Volumen von 450µl aufgefüllt und dazu 50µl einer 2,5M CaCl₂-Lösung gegeben. In 15ml Falkonröhrchen wurden pro Ansatz 500µl eines 2xHBS-Puffers vorgelegt. Dazu wurde tropfenweise die DNA-CaCl₂-Lösung gegeben, wobei gleichzeitig durch Einblasen von Luft über eine Pasteurpipette gemischt wurde. Das gebildete Präzipitat wurde nach 5-20min resuspendiert und tropfenweise zu den Zellen gegeben. Die Zellen wurden über Nacht inkubiert und nach 12-15h 2x mit PBS gewaschen und das Medium gewechselt.

Zur Überprüfung der Transfektionseffizienz wurden Kontrollzellen mit einem GFP (*Green Fluorescent Protein*) Konstrukt transfiziert.

3.3.3 Infektionen

Herstellung rekombinanter Retroviren

Die Technik des retroviralen Gentransfers ermöglicht die stabile Integration von Plasmid-DNA in das Genom von Säugerzellen. Als Vektoren dienen Plasmide der pBabe-Gruppe (Morgenstern und Land, 1990), in die entsprechende cDNA Sequenzen inkloniert waren.

Die Herstellung von ekotrophen rekombinanten Retroviren zur Infektion von murinen Fibroblasten erfolgte unter Verwendung der Phoenix^{eco} Helferszelllinie. Diese wurden im Verhältnis 1:4 bis 1:6 auf 10cm Kulturschalen ausplattiert und am nächsten Tag nach der

Kalziumphosphat-Methode (siehe 3.3.2) mit den entsprechenden Vektoren transfiziert. Zur Ankonzentrierung des Virusüberstandes nach dem Waschen wurde nur 6ml Medium auf die Zellen gegeben. 48h nach Transfektion wurde der Virusüberstand von den Zellen abgenommen, in 15ml Falcon-Röhrchen überführt, mit Polybrene zur Verstärkung der Infektionsrate versetzt und mit 0,45µm Sterilfiltern filtriert. Der Virusüberstand wurde sofort zur Infektion verwendet oder in Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Die Phoenix^{eco} Helferzellen wurden erneut mit 6ml Medium versetzt, weitere 24h inkubiert und der zweite Virusüberstand nach dem zuvor beschriebenen Verfahren geerntet und sofort verwendet bzw. eingefroren.

Infektion

Zur Infektion wurden E2f6^{-/-} und Kontrollfibroblasten 4 Tage vor der Infektion aufgetaut (P-2), in 10cm Kulturschalen plattiert, expandiert und am Abend vor der Infektion in einer Dichte von 8×10^5 Zellen auf 10cm Schalen ausgesät.

Am nächsten Tag wurde das Medium entfernt und je 10cm Schale 6ml des Virusüberstandes (s.o.) zugegeben und 8h inkubiert. Danach wurden 4ml frisches Medium hinzugefügt und am nächsten Morgen erfolgte die zweite Infektion mit dem zweiten Virusüberstand.

Die hier verwendeten pBabe Vektoren tragen ein Puromycin Resistenzgen. Die infizierten Fibroblasten wurden 48h nach Erstinfektion zur Selektion 1:2 passagiert und für 48h-72h mit 1.5µg/ml Puromycin behandelt. Eine uninfizierte Kontrollschale diente als Selektionskontrolle.

3.4 Histologische Methoden

3.4.1 Präparation von adulten Organen und Paraffineinbettung

Die in den Abschnitten 3.4.1 und 3.4.2 beschriebenen Methoden sind im Labor von Prof. Hans-Peter Elsässer (Institut für Zytobiologie und Zytopathologie; Philipps-Universität Marburg) mit der Unterstützung von Waltraut Sperling durchgeführt worden.

Zur Gewinnung von Mausorganen wurden 3 Monate alte männliche E2f6^{-/-} bzw. E2f6^{+/+} C57/Bl.6 Mäuse verwendet. Aus diesen Tieren wurden Milz, Thymus, Pankreas, Magen, Duodenum, Kolon, Niere, Lunge, Herz, Skelettmuskel, Klein- und Großhirn und Hoden präpariert und in Carnoy Lösung ü.N. bei 4°C fixiert. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Organe nicht dicker als 0.5 cm waren.

Die Gewebe wurden 3-5 Stunden in Isopropanol entwässert, ü.N. in Paraffin inkubiert und Paraffinblöcke gegossen. Von diesen Blöcken ausgehend wurden 6µm Dünnschnitte angefertigt.

3.4.2 Hämatoxylin-Eosin Färbung (H.E. Färbung)

Hämatoxylin ist ein (bei niedrigem pH-Wert) positiv geladener Farbstoff. Er färbt daher negativ geladene ("basophile") Strukturen blau, z.B. die DNA des Kernchromatins, die RNA des rauhen endoplasmatischen Retikulums oder die sauren Glykosaminoglykane des hyalinen Knorpels. Eosin ist ein negativ geladener Farbstoff, der zur Gegenfärbung dient. Er färbt alle übrigen Strukturen in verschiedenen Rot-Tönen ("Acidophilie").

Die Schnitte wurden zunächst entparaffiniert (absteigende Alkoholreihe: Xylol 5min, Xylol 5min, Isopropanol 5min, 96%Ethanol 3min, 80% Ethanol 3min, 70% Ethanol 3min, ddH₂O 1-2min) und anschließend für 3min in Hämatoxylin-Lösung inkubiert. Anschließend wurden sie unter fließendem Leitungswasser 10min „gebläut“. Für weiter 15min wurden die Schnitte in 0.1% wässrigem gelblichen Eosin getaucht und danach mit einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert (70% Ethanol, 80% Ethanol, 96% Ethanol, Isopropanol , 2x Xylol , jeweils 5min).

3.4.3 Knorpel und Knochenfärbung von Mausembryonen

Für die Färbung und Untersuchung von Skeletten wurden Skelette von neugeborenen Mäusen und von Mausembryonen vom Tag 18.5 der Embryonalentwicklung präpariert. Die Mäuse stammten aus einer über 3-4 Generationen zurückgekreuzten C57/Bl6 Linie.

Die Embryonen bzw. Neugeborenen wurden zunächst kurz in Leitungswasser gelagert, anschließend für 20sec - 30sec in 65°C – 70°C heißes Wasser gelegt, danach mit einer spitzen Pinzette vorsichtig die Haut abgezogen und so gut wie möglich die Muskeln und Organe entfernt, so dass das Skelett freipräpariert aber stabilisiert war. Die Skelette wurden für 3-5 Tage in 95% Ethanol entwässert und fixiert. Dabei war darauf zu achten, dass keine Blasen entstehen die eine Fixierung stören könnten. Zur Knorpelfärbung mit Alzian Blau wurden die Skelette 24h in Alzian Blau Färbelösung inkubiert, anschließend zweimal in 95% Ethanol gewaschen und für weitere 48 h in 95% Ethanol inkubiert.

Nach der Knorpelfärbung erfolgte die Knochenmazeration zur Entfernung organischer Substanzen in und um den Knochen: Hierzu wurden die Skelette für 2h-6h in 1% KOH

Lösung (w/v) bei 4°C inkubiert und regelmäßig kontrolliert, um eine zu lange Mazeration zu verhindern.

Die anschließende Knochenfärbung erfolgte durch Inkubation für 1h-3h in Alizarin Rot Lösung. Im Anschluss wurden die restlichen Gewebereste mit 2% KOH Lösung (w/v) abgedaut, bis das gefärbte Skelett deutlich zu erkennen war.

Zum Schluß erfolgte die Inkubation in einer 2% KOH:Glycerol Verdünnungsreihe (80%:20%, 60%:40%, 40%:60% und 20%:80%). In der letzten Verdünnung wurden die Skelette lange Zeit aufbewahrt. Die Auswertung und Dokumentation erfolgte mit einem Leica-BinokularTM und einer Canon ElanIIITM (Objektiv 100mm).

3.5 Molekularbiologische Methoden

3.5.1 Arbeiten mit DNA

3.5.1.1 Standardverfahren der Molekularbiologie

Alle Arbeitsschritte wurden sofern nicht anders vermerkt, bei 4°C ausgeführt. Verwendete Puffer, Medien und Lösungen wurden mit bisdestilliertem Wasser angesetzt und vor Gebrauch autoklaviert oder steril filtriert. Ihre Zusammensetzung kann, sofern nicht anders angegeben, den Methodenbüchern „Molecular Cloning, A laboratory Manual“ (Sambrook *et al.*, 1989), bzw. „Current Protocols in Molecular Biology“ (Ausubel *et al.*, 1987) entnommen werden. Als *E.Coli* Stamm wurden *DH5α* verwendet (Hanahan, 1983). Standardmethoden wie Restriktionsverdau, Transformation, Ligation, Agarosegelelektrophorese, Phenol/Chloroformextraktion und Ethanol-fällung sind den oben genannten Protokollbüchern zu entnehmen.

3.5.1.2 Isolierung und Aufreinigung von DNA aus Mausschwanz- und Embryonalgewebe

Zur Genotypisierung von Mäusen während der Zucht oder den zur Fibroblastenisolierung verwendeten Embryonen wurde DNA aus Mausschwanzbiopsien bzw. aus embryonalem Gewebe isoliert. Für die Mausschwanzbiopsien wurde 14 Tage alten Mäusen vorsichtig ein Gewebestück vom Schwanz abgeschnitten und dieses in 300µl *Tail*-Verdaupuffer, versetzt mit 15µl Proteinase K, ü.N. bei 55°C bei leichtem Schütteln verdaut (embryonales Gewebe: 1000µl *Tail*-Verdaupuffer + 30µl Proteinase K).

Am nächsten Morgen wurde die Probe für 15sec intensiv auf einem Vortexgerät geschüttelt, die Proteinase K durch Erhitzen für 10min bei 95°C inaktiviert und die Probe anschließend bei RT wieder abgekühlt. Nach einem Zentrifugationsschritt wurde 1µl aus dem Überstand für eine Genotypisierung mit einer PCR verwendet (siehe 3.5.1.4).

Für einige PCR Reaktionen war es notwendig die DNA aufzureinigen. Dazu wurde die Probe mit 166.7µl 6M NaCl Lösung versetzt und gründlich auf einem Vortexgerät durchmischt. Es folgte eine Zentrifugation (max., 10min, 4°C), der Überstand wurde in ein frisches Eppendorf Reaktionsgefäß überführt und mit 767µl 95% Ethanol (v/v) versetzt. Die Probe wurde durch invertieren vorsichtig durchmischt, um Scherkräfte zu vermeiden. Die DNA wurde durch Zentrifugation (max., 2min, 4°C) pelletiert, der Überstand verworfen, die DNA kurz luftgetrocknet, mit eiskaltem 70%igem Ethanol (v/v) gewaschen, vorsichtig durchmischt, pelletiert (max., 1min, 4°C), kurz angetrocknet und abschließend in 100µl TE Puffer aufgenommen. Die Rehydrierung der DNA erfolgte ü.N. bei Raumtemperatur.

3.5.1.3 Photometrische Bestimmung von Nukleinsäuren

Die DNA bzw. RNA Konzentration einer wässrigen Lösung wurde durch die Messung der Optischen Dichte (OD) in einer Quarzküvette mit einer Schichtdicke von 1cm bestimmt. Eine Absorptionseinheit entspricht bei 260nm 50µg/ml DNA bzw. 40µg/ml RNA, so dass sich die Konzentration durch die folgenden Formeln berechnen lässt:

$$c[\text{DNA, } \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}] = \text{OD}_{260} * \text{Verdünnungsfaktor} * 50$$

$$c[\text{RNA, } \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}] = \text{OD}_{260} * \text{Verdünnungsfaktor} * 40$$

Durch gleichzeitige Messung bei 280nm erhält man aus dem Quotienten $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ Aufschluss über die Reinheit einer DNA- bzw. RNA-Präparation. Der Quotient $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ sollte bei einer ausreichenden Reinheit Werte von 1.8 ± 0.2 aufweisen.

3.5.1.4 PCR

Zur Genotypisierung von Mauslinien, muriner embryonaler Fibroblasten und zur semi-quantitativen Expressionsanalyse spezifischer Gene wurde die Polymerase- Ketten-Reaktion (*Polymerase Chain Reaction*, PCR) verwendet.

Alle Reaktionen wurden mit der DNA-abhängigen DNA-Polymerase aus *Thermophilus aquaticus* (*Taq*-Polymerase) in einem T1 Thermocycler durchgeführt. Für die Reaktionen wurden die mit der *Taq*-Polymerase gelieferten Reagentien verwendet. Die Ansätze zur DNA Amplifikation setzten sich aus 5µl 10xPCR Puffer, 5µl 2mM dNTPs, 1.5µl-3µl 50mM MgCl₂, je 1µl 10µM Oligonukleotide, 0.25µl *Taq*-Polymerase zusammen und wurden mit ddH₂O auf 50µl aufgefüllt. Die Sequenzen der jeweils verwendeten Oligonukleotide sind in Abschnitt 2.3 zusammengefasst. Die gewählten Temperaturzyklen (Denaturierung, Hybridisierung der Oligonukleotide) sowie die Zyklenanzahl sind den jeweiligen Abschnitten zu entnehmen.

3.5.1.5 Genotypisierung von Mäusen und Embryonen

Zur Feststellung des E2f6 Genotyps von Mäusen oder Gewebeproben von isolierten Embryonen wurden die Oligonukleotide SG113, SG 114 und SG 130 (siehe 2.3), 2.5 mM MgCl₂ und 1% DMSO verwendet:

Folgende Temperaturbedingungen wurden für die PCR Reaktion gewählt:

- | | | | |
|--|------------------------|------|----------------------------|
| (1) | Initiale Denaturierung | 95°C | 10min |
| Zugabe von 0.25µl Taq Polymerase nach 8min; <i>Hot Start</i> Verfahren | | | |
| (2a) | Denaturierung | 94°C | 5 sec |
| (2b) | Denaturierung | 92°C | 45 sec |
| (3) | Hybridisierung | 57°C | 45 sec zurück zu (2a), 40x |
| (4) | Polymerisation | 72°C | 2min |
| (5) | Endstrangsynthese | 72°C | 10 min |
| (6) | Aufbewahrung | 4°C | Pause |

Der gesamte PCR Ansatz wurde in einem 1.4% Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und dokumentiert. Im Falle eines E2f6^{-/-} Genotyps war eine Fragmentgröße von 362bp zu erwarten, in E2f6^{+/+} Proben dagegen eine Größe von 493bp, heterozygote Mäuse weisen beide Fragmente auf.

3.5.2 Arbeiten mit RNA

Alle zur Arbeit mit RNA verwendeten Lösungen wurden zur Inaktivierung von Ribonukleasen (RNAsen) mit DEPC (**Diethylpyrocarbonat**) behandelt, Ausnahme waren TRIS gepufferte Lösungen, die mit DEPC behandelten ddH₂O angesetzt wurden. Glasgefäße, Gelelektrophoresekammern und sonstige Gebrauchsmaterialien zum Arbeiten mit RNA wurden vor Gebrauch sorgfältig gereinigt und zur Inaktivierung von RNAsen mit 0.1N NaOH gespült.

3.5.2.1 Isolierung von RNA mit dem *RNAeasy*TM Kit

Zur Isolierung der Gesamt-RNA aus kultivierten Zellen wurde der *RNAeasy*TM -Kit der Firma Qiagen benutzt und nach den Anweisungen des Herstellers verfahren. Zur Entfernung von DNA Verunreinigungen auf den verwendeten Säulen, wurden diese mit DNase nach den Angaben des Herstellers (Quiagene) für 15min bei Raumtemperatur behandelt. Anschließend wurden die Säulen gewaschen und die RNA sofern nicht anders angegeben in 50µl eluiert. Die Konzentration und Reinheit der RNA wurde durch Messung der Absorption bei 260nm und 280nm Wellenlänge im Spektrophotometer bestimmt (siehe 3.5.1.3) oder durch elektrophoretische Auftrennung in einem denaturierenden Formaldehyd-Agarosegel (siehe 3.5.2.6) überprüft. Die RNA wurde je nach Verwendung aliquotiert und bei -80°C gelagert.

3.5.2.2 Isolierung von RNA mit *TRIZOL*TM Reagenz

Je nach Verwendungszweck wurde RNA aus kultivierten Zellen mit *Trizol*TM Reagenz isoliert, einer monophasischen Lösung aus Phenol und Guanidin-Isothiocyanat. Hierzu wurde nach Abnahme des Mediums 1ml *TRIZOL*TM /10cm Schale auf die Zellen gegeben, diese mit einem Zellschaber abgekratzt und das Lysat in ein 2ml Eppendorf Reaktionsgefäß überführt. Nach 5min Inkubation bei RT wurde das Lysat mit 200µl Chloroform versetzt, 15sec geschüttelt, 2-3min bei RT inkubiert und die Phasen durch Zentrifugation (16200rpm, 10min, 4°C) getrennt. Die wässrige obere Phase wurde in ein frisches Eppendorf Gefäß mit 500µl eiskaltem Isopropanol überführt, 10min bei RT inkubiert und die RNA durch Zentrifugation (11400rpm, 10min, 4°C) pelletiert. Die RNA wurde mit 75%

Ethanol gewaschen, zentrifugiert (9000rpm, 5min, 4°C) und anschließend in 30µl-50µl DEPC-H₂O aufgenommen.

3.5.2.3 Isolierung von RNA aus Mausgeweben

Um RNA aus Mausorganen zu isolieren, wurden aus einer ein E2f6^{-/-} C57/Bl.6 Maus und einem Kontrolltier Organe präpariert, diese mit einem Skalpell zerkleinert, zügig in ein Eppendorff Reaktionsgefäß überführt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei –80°C gelagert. Die Isolation der RNA aus den Organen erfolgte mit *TRIZOL™*. Dazu wurden die Organstücke mit 1ml *TRIZOL™* /100mg Organgewebe mit einem Rotor-Stator Gewebehomogenisator zerkleinert und die Zellen mechanisch aufgeschlossen. Durch Zentrifugation (13 000 rpm, 10 min, 4°C) wurden extrazelluläre Membranen, Polysaccharide und chromosomale DNA pelletiert. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt, 5 min bei RT inkubiert, mit 200 µl Chloroform versetzt, kräftig geschüttelt und erneut für 3 min bei RT inkubiert. Alle weiteren Schritte erfolgten wie in Abschnitt 3.5.2.2 beschrieben. Die RNA wurde in 50µl–100µl DEPC-H₂O je nach Größe des RNA Pellets gelöst und die Konzentration bestimmt (siehe 3.5.1.3).

3.5.2.4 DNase Behandlung von RNA Proben

Um die mit *TRIZOL™* isolierten RNA Proben von DNA Kontaminationen zu reinigen, wurde der RQ-1 DNase Kit verwendet. Hierzu wurden 10-30µg RNA mit 10µl RQ-1 10x Reaktionspuffer, 2µl RNAsin, 10µl RQ-1 RNase freier DNase versetzt und mit DEPC-H₂O auf ein Volumen von 100µl aufgefüllt. Der DNase Verdau betrug ca. 30min bei 37°C und wurde durch Zugabe von 10µl Stopplösung und 90µl H₂O beendet und die RNA anschließend mit Phenol/Chloroform gefällt.

3.5.2.5 Phenol/Chloroform Extraktion und Fällung von RNA

Um RNA aus Proteingemischen aufzureinigen, wurden RNA Proben mit Phenol/Chloroform gereinigt und mit 5M Ammoniumacetat (NH₄⁺Ac; pH 5.7) präzipitiert. Die RNA Proben wurden mit dem gleichen Volumen Phenol/Chloroform (1:1) versetzt und auf einem Vortex Gerät geschüttelt. Anschließend wurden die Phasen durch Zentrifugation (max., 3min, RT) getrennt und die wässrige Phase überführt. Die Fällung der RNA erfolgte

sofern nicht anders angegeben durch Zugabe des gleichen Volumenanteils 5M NH_4^+Ac (pH5.7) und des vierfachen Volumenanteils an 100% Ethanol. Das Gemisch wurde mind. 24h oder bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert. Die Präzipitation erfolgte durch Zentrifugation (max., 15min, 4°C). Das RNA Präzipitat wurde mit 70% Ethanol (v/v) gewaschen und anschließend in $20\mu\text{l}$ - $50\mu\text{l}$ DEPC H_2O aufgenommen.

3.5.2.6 Trennung von RNA in denaturierenden Formaldehydgelen

Zur Qualitätskontrolle der isolierten RNA wurde ein Aliquot der RNA Probe durch ein denaturierendes Formaldehyd-Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Hierzu wurden 1.2g Agarose in 72ml DEPC- H_2O aufgekocht und die gelöste Agarose anschließend auf ca. 60°C abgekühlt. Es wurden dann 18ml Formaldehyd (37% w/w) und 10 ml 10x MOPS-Puffer zugegeben und das Gemisch in eine Gelkammer gegossen. Sofern nicht anders angegeben, wurden ca. $5\mu\text{g}$ RNA mit RNA Probenpuffer (siehe 2.7.1) auf ein Volumen von $20\mu\text{l}$ gebracht, zur vollständigen Denaturierung für 10min bei 65°C inkubiert, mit $1\mu\text{l}$ RNA Ladepuffer (siehe 2.7.1) versetzt und anschließend direkt auf das Gel aufgetragen. Die Trennung erfolgte für 2h-4h bei 80V, die Proben wurden mit UV-Licht (254nm Wellenlänge) dargestellt und auf Gleichmäßigkeit und Sauberkeit überprüft.

3.6 Expressionsanalysen

3.6.1 Semiquantitative Expressionsanalyse mit RT-PCR

3.6.1.1 Reverse Transkription von RNA und cDNA Synthese

Zur semiquantitativen Analyse der Genexpression wurde Gesamt-RNA isoliert (siehe 3.5.2.1 und 3.5.2.2) und diese in eine cDNA (*copyDNA*) umgeschrieben (reverse Transkription; RT). Hierzu wurde die „*RNA abhängige retrovirale reverse Transkriptase*“ des *Maus Moloney Virus (M-MLV-RT)* verwendet. Als Oligonukleotide für die reverse Transkription wurden *Random* Oligonukleotide eingesetzt, deren komplementäre Sequenz häufig und gleichmäßig im Genom verteilt ist.

Für eine reverse Transkriptionsreaktion wurden $2.5\mu\text{g}$ RNA mit $0.5\mu\text{l}$ *Random* Oligonukleotiden und $5\mu\text{l}$ 2mM dNTPs versetzt und das Reaktionsvolumen auf $12\mu\text{l}$ mit DEPC H_2O aufgefüllt. Dieser Ansatz wurde dann für 5min bei 65°C in einem T1 Thermocycler zur Denaturierung erhitzt und anschließend für 2min auf Eis gekühlt. Es folgte die Zugabe

von 4µl Reaktionspuffer, 2µl 0.1M DTT und zur Stabilisierung wurde 1µl RNAsin zugegeben. Dieser Ansatz wurde für 10min bei 25°C zur Hybridisierung der Oligonukleotide inkubiert. Die reverse Transkription wurde durch Zugabe von 1µl *M-MLV-RT* gestartet und für 50min bei 37°C durchgeführt. Es folgte eine Inaktivierung des Enzyms durch Erhitzen auf 70°C für 15min. Auf diese Weise wurden 20µl cDNA erhalten. Eine Reaktion wurde ohne reverse Transkriptase angesetzt, um DNA Kontaminationen in den RNA Proben auszuschließen.

3.6.1.2 Spezifische Amplifizierung von cDNA

Zur spezifischen Amplifizierung der cDNA wurden PCR Reaktionen durchgeführt (siehe 3.5.1.4). Je Ansatz wurden 2µl cDNA eingesetzt. Die Temperatur- und Reaktionsbedingungen für die jeweiligen genspezifischen Oligonukleotide (Sequenz siehe 2.3) wurden optimiert und angepasst, so dass die Menge des Endprodukts im linearen Bereich lag und eine semiquantitative Analyse der Expression spezifischer Gene möglich war. In einem T1 Thermocycler wurde folgendes Programm verwendet:

- | | | | |
|-----|------------------------|------|-----------------------------|
| (1) | Initiale Denaturierung | 95°C | 3min |
| (2) | Denaturierung | 95°C | 30 sec |
| (3) | Hybridisierung | X°C | 45 sec zurück zu (2); x-mal |
| (4) | Polymerisation | 72°C | 45 sec |
| (5) | Endstrangsynthese | 72°C | 10 min |
| (6) | Aufbewahrung | 4°C | Pause |

Für alle Reaktionen wurden die Magnesiumkonzentration und die Anzahl der Zyklen optimiert:

Gen	Primer	MgCl ₂ +/-DMSO	Hybridisierung	Zyklen	Größe
Aktin	SG106xSG107	1.5mM	55°C	26-28	500
BRCA1	SG 252xSG 253	1.5mM	55°C	32	300
E2F6	SG122xSG112	1.5mM	55°C	32 -34	300
HP1α	SG 254xSG 255	1.5mM	55°C	32	300

RbAp48	SG 256xSG257	1.5mM	55°C	32	300
p16^{INK4a}	SG 96xSG97	1.5mM	55°C	32	300
p19^{ARF}	SG 98xSG98	1.5mM	55°C	32	300
Smc112	SG 270xSG 271	1.5mM	55°C	32	300
Stag3	SG 272xSG 273	1.5mM	55°C	32	300
XM_196054	SG 315xSG 316	2.5mM 10%DMSO	53°C	36	300

Tabelle 3.1: Oligonukleotide und PCR Bedingungen für die Amplifizierung von cDNA zur semiquantitativen Expressionsanalyse

Die PCR Produkte wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und unter UV-Licht analysiert.

3.6.2 Expressionsanalyse mit in-situ Hybridisierungen

Um die gewebe- und zellspezifische Expression von Genen während der Embryonalentwicklung zu untersuchen, wurde die Methode der in-situ Hybridisierung verwendet. Grundlage dieser Methode ist die Hybridisierung einer markierten RNA (RNA-Sonde) mit der komplementären mRNA des zu untersuchenden Gens. Die Markierung der RNA-Sonde ermöglicht die sensitive und spezifische Detektion der RNA-RNA Hybride und eine Darstellung der Expressionsbereiche eines Gens.

3.6.2.1 Präparation von Digoxigenin markierten RNA Sonden

Für die Herstellung von RNA-Sonden für eine in-situ Hybridisierung mit seiner komplementären mRNA wurden die in Tabelle 3.2 aufgeführten Plasmide verwendet (siehe auch 2.4).

Die Plasmide wurden durch einen Restriktionsverdau linearisiert (siehe Tabelle 3.2), durch eine anschließende Agarosegelelektrophorese die linearisierten Plasmide aufgetrennt, unter UV Belichtung herausgeschnitten, mit dem *Quiagene Gel Extraction KitTM* aufgereinigt und in 50µl EB Puffer eluiert.

Anschließend wurde durch eine *in-vitro* Transkription unter Verwendung des DIG RNA Labeling Kits die RNA Probe generiert und markiert (siehe Tabelle 3.2). Die Markierung erfolgte durch die Inkorporation von Digoxigenin markierten dUTP während der Transkription. Hierzu wurden 10µl linearisierte Plasmid DNA mit 4µl DIG RNA Labeling

Mix, 10µl Transkriptionspuffer, 2µl DNA-abhängige RNA Polymerase, 2µl RNAsin und 18µl DEPC H₂O versetzt und für 3h bei 37°C inkubiert. Die DNA wurde anschließend durch Zugabe von RNase freier DNase aus dem Ansatz enzymatisch entfernt und die RNA gefällt, gewaschen, in 100µl DEPC H₂O aufgenommen und mit 1µl RNasin versetzt. 2µl der RNA Probe wurde mit einem nativen 1.5% TBE Gel auf Quantität und Qualität überprüft.

Um die Inkorporation von DIG markierten Nucleotiden in die RNA zu testen, wurde der *DIG Nucleic Acid KitTM* (Roche) verwendet und nach den Angaben des Herstellers verfahren.

Plasmid	Linearisierung	Polymerase
pcDNA3 mE2F6	BamHI	Sp6
pT3T7lac Hox C9	EcoRI	T3
pSAFYre Hox C10	EcoRI	Sp6
pBluescript KS+ Hox B3	BamHI	T3
pT3T7lac Hox C11	EcoRI	T3
HoxD9	BamHI	T3
pBluescript IKS+ Hox B8	HindIII	T7
pBluescript IKS+ Hox C8	HindIII	T7

Tabelle 3.2: Plasmide zur in-situ Hybridisierung, zur Linearisierung verwendete Restriktionsenzyme und zur *in-vitro* Transkription verwendete DNA-abhängige RNA Polymerasen

3.6.2.2 In-situ Hybridisierung an ganzen Embryonen

Durchführung

Zur in-situ Hybridisierung an ganzen Embryonen wurden 9.5 Tage alte Embryonen aus dem Uterus präpariert (siehe 3.1.4) und zunächst in einer absteigenden Methanolreihe (100%, 75%, 50%, 25% in PBS-T (v/v); Inkubation auf Eis für jeweils 5min) rehydriert und 3x in PBS-T gewaschen.

Um die Zugänglichkeit des Gewebes für die RNA-Sonde zu verbessern, wurden die Embryonen für 9min mit Proteinase K (4.5µg/ml in PBS-T) bei RT inkubiert. Der Verdau wurde durch zweimaliges Waschen in Glycinlösung (2mg/ml in PBS-T) für jeweils 5min, gefolgt von dreimaligem Waschen in PBS-T für jeweils 5min, gestoppt. Die Embryonen wurden anschließend in 5ml 4% Paraformaldehyd/0.2% Glutaraldehyd (v/v) für 15min auf

Eis refixiert. Nach dreimaligen Waschen in PBS-T für jeweils 5min auf Eis erfolgte eine Inkubation in Prähybridisierungslösung (50%PBS-T: 50% Hybridisierungslösung) bzw. in Hybridisierungslösung (siehe 2.7.2.2) für jeweils 3min auf Eis. Zur Vorbereitung der RNA Hybridisierung wurden die Embryonen in 900µl frischer Hybridisierungslösung für 3h bei 65°C präinkubiert. Die RNA Probe wurde in 100µl Hybridisierungslösung aufgenommen, zur Denaturierung für 5min bei 95°C erhitzt und unmittelbar danach zu den Embryonen in der präinkubierten Hybridisierungslösung gegeben. Die RNA Hybridisierung erfolgte ü.N. bei 70°C im Wasserbad.

Am nächsten Tag wurde die Hybridisierungslösung entfernt und durch 800µl Prähybridisierungslösung (50%PBS-T: 50% Hybridisierungslösung) ersetzt und für 5min bei 70°C inkubiert. Anschließend wurde dreimal 400µl 2xSSC pH 4.5 mit jeweils 5min Inkubation bei 70°C zu den Embryonen gegeben. Im Anschluss wurde die Lösung entfernt und die Embryonen zweimal für 30min mit 2xSSC pH7.0/0.1%CHAPS bei 70°C gewaschen. Danach folgte ein zweimaliges Waschen für jeweils 10min mit 100mM Maleinsäurepuffer pH 7.5 bei Raumtemperatur und für jeweils 30min bei 70°C.

Pufferreste wurden durch Waschen mit PBS und PBS-T für jeweils 5min bei RT entfernt. Die Embryonen wurden zur Vorbereitung der Antikörpermarkierung in Antikörper Puffer für 2h bei 4°C unter gleichzeitigem Schütteln geblockt und währenddessen der anti-DIG-AP Antikörper 1:10.000 in 1.5 ml Antikörperpuffer präinkubiert. Anschließend wurden die Embryonen ü.N. in Antikörperlösung bei 4°C unter gleichzeitigem Schütteln inkubiert.

Am nächsten Tag wurden die Embryonen zunächst in PBS-T/ 0.1% BSA mehrfach gewaschen. Hierzu wurde die Waschlösung regelmäßig gewechselt, die Inkubation erfolgte zwischen 24h-48h.

Zur Färbung wurden die Embryonen schließlich erneut zweimal für 30min bei Raumtemperatur in PBS-T gewaschen und währenddessen die Färbelösungen vorgewärmt. Es folgte zweimaliges Waschen in AP-1 Puffer (siehe 2.7.2.2) für jeweils 10min bei Raumtemperatur. Danach wurden die Embryonen mit *BM Purple* Lösung inkubiert, im Dunkeln geschüttelt und regelmäßig die Färbung und Hintergrundintensität kontrolliert. Die Färbung konnte zwischen wenigen Stunden und ca. 24h beanspruchen. Sobald Hintergrundsignale erkennbar waren erfolgte ein dreimaliges Waschen mit PBS und eine abschließende Dehydrierung in einer aufsteigenden Methanolreihe. Die Auswertung erfolgte unter einem Bino-kular, zur Dokumentation wurde die IM100 Software verwendet.

Auswertung

In dieser Arbeit wurden die anterioren Expressionsgrenzen von homeotischen Genen (Hox-Gene) entlang der antero-posterioren Achse am Tag 9.5 der Embryonalentwicklung bestimmt. Dabei wurden die Somiten gezählt und dokumentiert, in denen mit einer in-situ Hybridisierung keine Expression eines spezifischen Hox-Gens detektiert werden konnte (ungefärbte Somiten). Da z.T. die anterioren Somiten in der Entwicklung verschmelzen wurden die Gliedmaßenknospen, die an definierter Stelle entlang der antero-posterioren Achse lokalisiert sind, als Orientierung zur Auszählung verwendet. Es kann davon ausgegangen werden, dass die angegebene Somitenzahl auf diese Weise korrekt gezählt wurde (+/- 1 Somite).

3.6.3 Expressionsanalysen mit einem cDNA *Microarray*

Prinzip

Mit Hilfe der *Microarray* Technologie kann das Expressionsmuster (Transkriptom) einzelner Zellen, einer Zellpopulation oder von Gewebeproben für eine große Anzahl von Genen simultan bestimmt und verglichen werden. Grundlage dieser Methode ist ein Probenträger (*Microarray-Slide*), auf den eine große Anzahl an Proben an definierter Position in Form von cDNA, Genfragmenten oder Oligonukleotiden aufgebracht und fixiert ist (im Folgenden als *Spots* bezeichnet).

Aus dem zu untersuchenden Zellmaterial oder dem Gewebe wird RNA isoliert, in eine cDNA umgeschrieben und diese mit den fluoreszierenden Farbstoffen *Cy3*, bzw. *Cy5* markiert. Gleichfalls wird mit einer Referenzprobe von Zellen oder Geweben verfahren. Die beiden unterschiedlich markierten cDNA Proben werden gemischt, mit dem *Microarray-Slide* hybridisiert und anschließend das Fluoreszenzmuster analysiert und verglichen. Die relative Fluoreszenzintensität eines *Spots* auf dem *Microarray-Slide* ist dabei proportional zu der Menge an Transkripten in dem Ausgangsmaterial. Ist ein Fluoreszenzsignal im Vergleich zur Referenz stärker oder schwächer, deutet dies auf eine veränderte Expression des Gens hin. Dies kann mit entsprechenden statistischen Verfahren ausgewertet und quantifiziert werden.

Versuchsaufbau

In dieser Arbeit wurde ein cDNA *Microarray* verwendet, auf den 11.500 cDNA *Spots* aufgebracht waren. Von diesen 11.500 Genen stammen 9000 Gene aus einer 15K und weitere

2500 Gene wurden aus einer 7K Maus cDNA Bibliothek (*15k und 7K mouse cDNA library, National Institute of Aging; USA*). Die *Microarray-Slides* wurden in der *Microarray Unit* des Instituts für Molekularbiologie und Tumorforschung, Philipps-Universität Marburg, unter der Leitung von Dr. Michael Krause erstellt.

Die Probenaufbearbeitung erfolgte mit dem *CyScribe Post-Labeling KitTM* (Amersham). Grundlage des *Post-Labeling* Verfahrens ist die Markierung der cDNA mit Amino-Allyl-dUTP (aadUTP). Dieses modifizierte dUTP wird in einer anschließenden Kopplungsreaktion kovalent mit monoreaktiven CyDyeNHS Fluoreszenzfarbstoffen verknüpft (DeRisi *et al.*, 1997; Heller *et al.*, 1997).

RNA Probenvorbereitung und cDNA Synthese

Zur Analyse der Genexpression in E2F6 defizienten Zellen wurde Gesamt RNA aus E2f6^{-/-} und Kontrollfibroblasten präpariert (siehe 3.5.2.1), die durch Serumentzug/ Seruminduktion synchronisiert wurden und sich in der S-Phase des Zellzyklus befanden (siehe 3.2.4). Nach der Isolierung wurden 30µg-50µg RNA gefällt (siehe 3.5.2.5), in 8µl DEPC H₂O aufgenommen und mit 3µl dTTP-Oligonukleotiden versetzt. Die RNA wurde durch Inkubation bei 70°C für 5min denaturiert und die dTTP-Oligonukleotide durch langsames Abkühlen hybridisiert. Zur Synthese der aaUTP markierten cDNA wurden 4µl CyScript Reaktionspuffer, 2µl 0.1M DTT, 1µl 20xdNTP Lösung, 1µl aaUTP und 1µl reverse Transkriptase zugegeben und für 1.5h bei 42°C inkubiert.

Anschließend wurden die RNA Reste aus der Probe durch Zugabe von 2.5M NaOH (15min bei 37°C) entfernt. Die alkalische Lösung wurde mit 10µl 2M HEPES neutralisiert und die cDNA Probe mit dem *PCR Purification KitTM* der Firma Quiagen entsprechend der Instruktionen des Herstellers aufgereinigt. Die Elution der cDNA erfolgte 2x mit 30µl pH8.0 DEPC H₂O. Das Eluat wurde mit einer *Speed Vac* auf ein Volumen von 15µl ankonzentriert.

Fluoreszenzmarkierung der cDNA Probe

Zur Markierung der Aminoallylreste der cDNA mit Cy3 und Cy5 Farbstoffen wurden diese in je 15µl 0.1M NaHCO₃, pH9.0 gelöst und jeweils zu der E2f6^{+/+} oder der E2f6^{-/-} Probe gegeben. Die Veresterung der Farbstoffe erfolgte für 1h bei RT im Dunkeln. Anschließend wurden die Proben erneut über den *Quiagene PCR Purification KitTM* aufgereinigt und dabei die Cy3 und Cy5 markierte E2f6^{-/-} bzw. E2f6^{+/+} cDNA in dem Quiagene Bindungspuffer (Puffer PB) zusammengeführt. Die Elution erfolgte zweimal mit 30µl H₂O, pH8.0.

Zum Blocken während der Hybridisierung wurde 20µl Cot1 DNA (1mg/ml, Invitrogen) und 4µl PolyA (5µg/µl; Dr. Michael Krause) zugegeben und das Gesamtvolumen der Proben in einer *SpeedVac* auf 26µl reduziert.

Vor der Hybridisierung wurde die Probe mit 10µl 20xSSC und 4µl 2% SDS (w/v) versetzt.

Hybridisierung

Die *Microarray-Slides* wurden zunächst für 20-30min in Blocklösung bei 55°C inkubiert, in H₂O 3min gewaschen und vorsichtig zentrifugiert (1500rpm, 3min, RT). Bis zum Auftragen der Probe wurden die *Microarray-Slides* bei 55°C gelagert und vorgewärmt.

Die aufgereinigten, fluoreszenzmarkierten cDNA Proben wurden für 3min bei 95°C gekocht, unmittelbar danach unter Vermeidung von Luftblasen auf die *Microarray-Slides* getropft und mit einem zweiten *Microarray-Slide* bedeckt, so dass die cDNA Probe mit zwei *Microarrays* gleichzeitig hybridisierte (Doppelansätze; „*Sandwich-Methode*“). Dieses „*Microarray-Sandwich*“ wurde vorsichtig in ein 50ml Falkonröhrchen, das mit einem KimwipeTM Lite Tuch benetzt mit 1ml 3xSSC/ 0.1% SDS ausgelegt war, geschoben und ü.N. bei 55°C hybridisiert.

Nach der Hybridisierung wurden die „*Micrray-Sandwiches*“ vorsichtig in Waschlösung I (200ml H₂O, 0.1xSSC/ 0.1%SDS) getrennt, für 3x5min mit Waschlösung I und für 2x5min in Waschlösung II (200ml H₂O, 0.1x SSC) gewaschen, kurz mit H₂O gereinigt (ca. 30sec) und zentrifugiert (1500rpm, 3min, RT).

Auswertung der cDNA Microarrays

Die *Microarray Slides* wurden mit einem GMS 418 Fluoreszenzscanner eingelesen und die Fluoreszenzintensitäten mit der IMAGENE 3.0 SoftwareTM (BioDiscovery Inc.; Marina Del Rey, Ca, USA) erfasst und verarbeitet.

In dieser Arbeit wurden die fluoreszenzmarkierten cDNA Proben mit 2 *Microarray-Slides* hybridisiert, so dass jeder cDNA Spot in Doppelansätzen analysiert wurde („*Sandwich-Methode*“). Gleichzeitig wurde das Experiment wiederholt und die zur Markierung verwendeten Farbstoffe getauscht („*Dye-Swap* Verfahren“). Somit wurden fluoreszenzmarkierte cDNA Proben 4x mit dem gleichen cDNA *Spot* auf den *Microarrays* hybridisiert und technische Ursachen einer unterschiedlichen Fluoreszenzintensität konnten detektiert und gegebenenfalls korrigiert werden.

Die ermittelte Fluoreszenzintensität wurde um den Hintergrundwert korrigiert und dieser Wert logarithmisch zur Basis 2 dargestellt. Anschließend konnten die Verhältnisse der Cy3

und Cy5 induzierten Fluoreszenzemissionen berechnet werden. Sofern das Emissionsverhältnis für alle 4 cDNA *Spots* nicht reproduzierbar war, wurden diese Proben aus der Auswertung entfernt (Qualitätskontrolle). Zur Identifizierung differentiell exprimierter Gene wurden die Mittelwerte der logarithmischen Emissionsverhältnisse aus den 4 cDNA *Spots* gebildet und die Gene entsprechend sortiert. Eine veränderte Genexpression wurde als x-fache veränderte Expression (*Fold change*) durch die Delogarithmierung dieser Mittelwerte angegeben. Die Auswertung erfolgte durch Oliver Hartmann aus dem Institut für Medizinische Biometrie und Epidemiologie, Marburg.

3.7 Biochemische Arbeitsmethoden

3.7.1 Luziferase Reporteranalysen

Das Enzym Luziferase aus *Lamprohiza Splendidula* (Glühwürmchen) spaltet Luziferin in einer ATP abhängigen Reaktion unter Emission von Licht. Die entstehenden Lichtblitze (*Relative Light Units*; RLU) genannt, können unter Verwendung eines Luminometers gemessen werden.

Durch Kopplung regulierender DNA-Sequenzen (Promotoren) mit dem Luziferase-Gen auf einem entsprechenden Plasmid erfolgt die Luziferase Expression unter der Kontrolle dieser Sequenz. Die Lumineszenz aus Lysaten Luziferase exprimierender Zellen ist ein direktes Maß für den Luziferase Proteingehalt der Zelle. Somit kann auf die Aktivität eines Promotors indirekt zurückgeschlossen und diese quantifiziert werden.

3.7.1.1 Luziferase Reporteranalyse in transient transfizierten Fibroblasten

Zur Untersuchung der Luziferaseaktivität in E2f6^{-/-} Fibroblasten und Kontrollzellen wurden diese transient nach der Lipofectamine Methode transfiziert (siehe 3.3.1). Alle Ansätze wurden in Triplikaten angefertigt. Das Reporterkonstrukt wurde mit 5µg/ Triplikat, das pCMV β-Galaktosidase Konstrukt mit 1µg/ Triplikat verwendet. Die transient transfizierten Fibroblasten wurden in der 24 Well Platte mit 0.5ml PBS pro Well gewaschen. Die Lyse erfolgte mit 150µl 1x Passiv Lysepuffer für 30min auf einem Schüttler bei RT.

Zur Detektion der Luziferase Aktivität wurden zwischen 20µl und 80µl Lysat verwendet. Hierfür wurden 350µl ATP-Puffer in Luziferase Röhrchen aliquotiert. Das Luminometer injizierte automatisch unmittelbar vor der Messung 150µl der Luziferinlösung zu den Pro-

ben. Das Lysat der Fibroblasten wurde unmittelbar vor der Messung zur ATP Lösung gegeben. Nach Injektion der Luziferin Lösung wurde die Zahl der Lichtblitze in einem Zeitraum von 10s durch das Luminometer bestimmt. Als Leerwert diente ATP Lösung ohne Lysat und wurde von der erhaltenen *RLU* der Proben subtrahiert.

3.7.1.2 Messung der β -Galaktosidase Aktivität

Um auszuschließen, dass Unterschiede in der Transfektionseffizienz der Reporterplasmide die relative Luziferase Aktivität verfälschen wurde das β -Galaktosidase Gen unter der Kontrolle eines in Eukaryonten konstitutiv aktiven Promotors transfiziert. β -Galaktosidase katalysiert mit β -Mercaptoethanol als reduzierenden Kofaktor die Spaltung von ONPG in gelbes Nitrophenol. Auf Basis dieser Reaktion wurde ein Enzymassay zur Bestimmung der Menge an β -Galaktosidase verwendet.

Hierzu wurden für 24 Proben 25ml LacZ Puffer, 1.75ml ONPG und 65 μ l β -Mercaptoethanol angesetzt und 1ml in Plastikkuvetten aliquotiert. Nach Zugabe von 50 μ l Lysat erfolgte eine photometrische Messung der optischen Dichte bei $\lambda=420\text{nm}$, sobald eine deutliche Gelbfärbung sichtbar war (in der Regel nach 30min). Als Leerwert diente LacZ-Puffer ohne Lysat.

3.7.1.3 Berechnung der relativen Luziferase-Aktivität

Zur Normierung der *RLU* der Luziferasemessung, abzüglich des arithmetischen Mittelwertes der Leerwerte, wurde durch die der Probe entsprechenden Absorptionswerte des β -Galaktosidase-Enzymtests dividiert.

$$X_{\text{norm.}} = \text{Luziferase Aktivität} / OD_{420\text{nm}}$$

Aus den drei normalisierten Werten jedes Triplikats wurde die Standardabweichung bestimmt. Die Analyse und grafische Darstellung der Werte inklusive der Standardabweichung als Fehlerbalken erfolgte mit *Microsoft ExcelTM*.

3.7.2 Herstellung von Proteinlysaten aus kultivierten Zellen

Zur Herstellung von Proteinlysaten aus Zellkulturen wurden die Zellen mit eiskaltem PBS gewaschen, anschließend mit einem Zellschaber in 1ml eiskaltem PBS abgekratzt und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation pelletiert (3000rpm, 5min, 4°C), der Überstand verworfen und das Pellet in einem 9-10x Volumen TNN Lysispuffer, der mit Proteinaseinhibitoren und dem Antioxidans DTT versetzt war, resuspendiert. Die Suspension wurde mit einer Pipette vorsichtig durchmischt und für 20min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden Membranen und nicht-lysierte Zellbestandteile zentrifugiert (14000rpm, 10min, 4°C) und der Überstand in ein frisches Eppendorf-Reaktionsgefäß gefüllt. Sofern nicht anders angegeben, wurde die Proteinmenge nach Bradford bestimmt, das Lysat aliquotiert und bei -80°C eingefroren.

3.7.3 Proteinbestimmung nach Bradford

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration von Lysaten aus Zellen diente die von Bradford beschriebene Methode. Durch Vergleich mit einer BSA-Referenzkurve wurde der Proteingehalt der Lysate bestimmt. Dazu wurden 1µl, 2µl, 4µl, 6µl und 8µl einer Lösung von BSA (1mg/ml) mit 150mM NaCl-Lösung auf 100µl aufgefüllt und mit je 1ml Bradford-Lösung versetzt. In der gleichen Weise wurden 1µl bzw. 2µl des Proteinlysats verwendet. Nach 10min Inkubation bei RT wurde die OD₅₉₅ der Proben gegen einen Leerwert ohne Protein bestimmt. Die Proteinkonzentration der Lysate wurde dann an der erstellten BSA-Referenzkurve abgelesen.

3.7.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Proteinlösungen wurden durch eine diskontinuierliche denaturierende Polyacrylamid Gelelektrophorese (Laemmli, 1970) entsprechend ihrem Molekulargewicht aufgetrennt.

Als Matrix wurden vertikale Gele aus mit Bisacrylamid vernetztem Acrylamid verwendet, die sich aus einem niedrigprozentigen Sammelgel und einem 7-15%igem Trenngel, je nach erwünschten Auftrennungsgrad, zusammensetzten. Vor dem Beladen der Gele wurde die aufzutrennende Proteinlösung mit 3x SDS Probenpuffer versetzt und für 5min bei 95°C inkubiert. Die Laufzeit ist abhängig von dem gewünschten Auftrennungsgrad, der anhand eines mitlaufenden Größenstandards nachvollzogen werden konnte. Die aufgetrennten Pro-

teinbanden wurden mit verschiedenen Verfahren (Coomassie-Färbung, Western-Blot; siehe 3.7.5 und 3.7.6) sichtbar gemacht.

3.7.5 Coomassie Färbung von SDS-Polyacrylamidgelen

Zur Anfärbung von Proteingelen wurden diese mit Coomassie Färbelösung für ca. 2min inkubiert. Die Entfärbung erfolgte mit *Destain* Lösung, bis die proteinspezifischen Banden gut sichtbar waren.

3.7.6 Western-Blot

Proteintransfer auf PVDF Membranen

Der Nachweis von aufgetrennten Proteinen erfolgte mit Hilfe von spezifischen Antikörpern. Hierzu wurden die mit der SDS Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine nach dem Naßblotverfahren auf eine PVDF-Membran transferiert.

Die Membran wurde hierzu zunächst in 100% Methanol präinkubiert und anschließend in Naßblotpuffer gewaschen. In einem Plastikrahmen wurden dann ein Schwammtuch, ein *Whatman* Papier und die Membran gelegt, das Gel auf die Membran unter Vermeidung von Luftblasen platziert, mit einem weiteren *Whatman* Papier und Schwammtuch überschichtet, der Rahmen geschlossen und in einer Blotkammer fixiert. In der Blotkammer wurde außerdem ein Behälter mit gefrorenem Wasser gestellt, um den Naßblotpuffer während des Transfers zu kühlen. Der Transfer erfolgte bei 200mA für 90min.

Ponceau Färbung von Membranen

Der Transfer wurde mit einer Ponceau Färbung überprüft. Hierzu wurde die Membran kurz in Ponceau Färbelösung inkubiert und anschließend in destilliertem Wasser vorsichtig gespült. Proteinbanden färben sich rot, so dass sowohl der Transfer als auch die gleichmäßige Beladung kontrolliert werden konnte.

Immunologische Markierung der Proteine

Die auf der Oberfläche der Nitrozellulose immobilisierten Proteine waren nun in weiteren Schritten immunologischen Reaktionen zugänglich. Zur Vermeidung unspezifischer Bindungen der Antikörper an die Membran wurde diese in Blocklösung überführt und für 30min bei RT auf einem Schüttler inkubiert. Frische Blocklösung wurde dann mit Erstan-

tikörper (siehe 2.5.1) versetzt und die Membran über Nacht bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde die Membran einmal für 10min und zweimal für 5min mit TBS-T gewaschen und für 2h in Blocklösung mit einem sekundären Meerrettich-Peroxidase gekoppelten Antikörper (Verdünnung 1:5000; siehe 2.5.1) bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte ein erneutes Waschen für einmal 10min und für zweimal 5min in TBS-T. Anschließend wurden die spezifischen Proteinbanden mit einem ECL *Western Blotting Detection System*TM (Amersham) auf *Hyperfilmen*TM (Amersham) detektiert. Die Schwärzung des Films ist in gewissen Grenzen der Menge an gebundenem Antikörper und damit der Menge an nachzuweisendem Protein proportional.

3.7.7 Immunpräzipitation

Diese Methode wurde zur spezifischen Aufreinigung einzelner Proteine oder von Proteinkomplexen aus einem Proteinlysats verwendet und dient zur Analyse der *in-vivo* Interaktion von Proteinen. Alle Schritte werden auf Eis oder bei 4°C durchgeführt, um einen proteolytischen Abbau zu vermeiden.

Zur Präzipitation von Proteinen wurde eine Proteinlösung (siehe 3.7.2) mit einem spezifischen Antikörper versetzt (je nach Antikörper zwischen 1-3 µg) und ü.N. bei 4°C auf einem Rotator inkubiert. Am nächsten Tag wurde der Antikörper an unlösliche, in Lysis Puffer äquilibrierte Protein-A oder Protein-G Sepharose *Beads* gekoppelt (25µl/Ansatz). Der Antikörper/ Epitop Komplex bindet nicht-kovalent an die Protein Sepharose. Nach Inkubation für 1h bei 4°C wurden die Sepharose *Beads* durch sanfte Zentrifugation präzipitiert (3000rpm, 2min, 4°C) und mit Lysispuffer, versetzt mit 1mM DTT und 10µg/ml PMSF, sechs-siebenmal gewaschen. Nach dem Waschen wurden die *Beads* in 35µl 3x Elektrophoresepuffer aufgenommen, für 5min bei 95°C gekocht und der Überstand auf ein SDS-Polyacrylamidgel geladen oder bei -20°C gelagert.

Als Ladekontrolle (*Input*) wurden, sofern nicht anders angegeben, 10% der Proteinmenge eingesetzt, die für die Immunpräzipitation verwendet wurde. Die Detektion der Proteine erfolgte nach dem Western-Blot Verfahren (siehe 3.7.4-3.7.6).

3.7.8 Chromatinimmunpräzipitationen

Prinzip

Durch Chromatinimmunpräzipitationen kann die Assoziation von Proteinen mit spezifischen DNA Abschnitten nachgewiesen werden. Hierbei werden Protein-DNA Komplexe chemisch vernetzt, der Proteinanteil des Komplexes durch spezifische Antikörper immunpräzipitiert und die DNA anschließend mit spezifischen Oligonukleotiden nachgewiesen. Das hier verwendete Protokoll basiert in modifizierter Form auf dem in Peggy Farnhams Labor entwickelten Protokoll zur Chromatinimmunpräzipitation (<http://mcardle.oncology.wis.edu/farnham>). Sofern nicht anders angegeben, erfolgten alle Schritte auf Eis, bzw. bei 4°C.

Präparation Anreicherung von Chromatin

Zur Präparation und Anreicherung von Chromatin aus murinen embryonalen Fibroblasten wurden diese ausgesät (P-2), expandiert und, sofern nicht anders angegeben, 8-12 konfluente 15cm Schalen verwendet. Zunächst wurden die Zellen durch Zugabe von 540µl Formaldehyd (37%)/ 20ml Medium für 10min unter sanftem Schütteln bei RT fixiert und die DNA-Protein Komplexe chemisch vernetzt. Die Fixierung wurde durch Zugabe von 2.5ml 1M Glycin gestoppt, 5min bei RT auf einem Schüttler inkubiert und die Schalen anschließend auf Eis gestellt. Die fixierten Zellen wurden zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen und mit einem Zellschaber zweimal in 3ml PBS gründlich abgekratzt und in ein 15ml Falcon überführt. Die Zellen wurden sanft zentrifugiert (1200rpm, 5min, 4°C) und in 1ml Zellysispuffer (siehe 2.7.2.4) resuspendiert. Die Lyse der Zellen erfolgte für 10min bei 4°C, dabei wurde die Probe regelmäßig mit einem Vortexgerät durchmischt und abschließend in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Durch eine weitere Zentrifugation (2800rpm, 5min, 4°C) wurden die Kerne pelletiert und der Überstand verworfen. Das Kernpellet wurde, in Abhängigkeit von der Größe, in 250µl-500µl Kernlysispuffer (siehe 2.7.2.4) resuspendiert und für weitere 10min auf Eis zur Lyse inkubiert. Jeweils 2-3 Kernpräparationen wurden dann in ein 15ml Falcon zusammengeführt, ohne dass ein Gesamtvolumen von 1.5ml überschritten wurde.

Mit einem Sonifiziergerät (Branson) wurde die DNA fragmentiert (10% Amplitude, 6x 10sec Sonifizierung, jeweils 30sec Pause). Dabei klarte die Kernsuspension deutlich auf. Es wurde darauf geachtet, dass keine Luftblasen entstehen und kein SDS ausfällt. Die Proben wurden anschließend wieder in ein Eppendorff Reaktionsgefäß überführt und zentrifu-

giert (max., 10min, 4°C). Der Überstand (Chromatin) wurde in ein 50ml Falcon überführt, mit IP-Verdünnungspuffer (siehe 2.7.2.4) 1:10 verdünnt, frische Proteinaseinhibitoren zugegeben, in 2ml Aliquots aufgeteilt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bis zum Gebrauch bei -80°C.

Ladekontrollen (Input)

Zur Erstellung einer Ladekontrolle (*Input*) wurden 50µl unverdünntes Chromatin verwendet und zur Auflösung der fixierten Protein-DNA Assoziation mit 2µl 5M NaCl versetzt, einem Tropfen Mineralöl überschichtet und ü.N. bei 65°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Am nächsten Tag wurde der Proteinanteil durch einen zweistündigen Proteinase K (2µl/Probe) Verdau bei 55°C unter leichtem Schütteln verdaut. 35µl des Chromatins wurden auf ein 1.2% Agarosegel geladen und Größe und Qualität des Chromatins durch eine elektrophoretische Auftrennung kontrolliert. Sofern nicht anders angegeben, wurden 2µl Chromatin mit einer Phenol/Chloroform Extraktion und einer anschließenden Säulenaufreinigung mit Quiagene *PCR Purification KitTM* Säulen aufgereinigt. Hierzu wurden 2µl Chromatin mit 250µl Elutionspuffer versetzt, gemischt und die gleiche Menge (252µl) Phenol zugegeben. Die Phasen wurden mit einem Vortex Gerät gründlich gemischt und durch Zentrifugation (max., 3min, RT) getrennt. Die wässrige Phase wurde vollständig in ein frisches Reaktionsgefäß überführt, mit 250µl Chloroform versetzt, gemischt und zentrifugiert (max., 3min, RT). Die wässrige Phase wurde überführt und mit 1200µl Bindepuffer des *Quiagene Purification KitsTM* versetzt. Die Proben wurden über die Quiagene Säulen entsprechend den Herstellerangaben aufgereinigt und in 50µl Elutionspuffer eluiert. Für eine Kontroll PCR wurden sofern nicht anders angegeben 1.5µl Probe verwendet und die PCR Signale einer E2f6^{-/-} Chromatinpräparation mit einer E2f6^{+/+} Kontrollpräparation verglichen. Es wurden ausschließlich Präparationen verwendet, in denen die PCR Signalintensität zwischen E2f6^{-/-} und Kontrollproben identisch war.

Immunpräzipitationen

Hierzu wurde zunächst Protein-A, bzw. Protein-G Sepharose in 3ml IP-Verdünnungspuffer (siehe 2.7.2.4) aufgenommen, mit 30µl ssDNA (10mg/ml) und 150µl BSA (20mg/ml) versetzt und ü.N. bei 4°C geblockt, um unspezifische Protein- und DNA Bindungen an die Sepharose *Beads* zu verhindern.

35µl geblockte Protein-A, bzw. Protein-G Sepharose wurden zu 2ml Chromatin gegeben und für 20min-30min bei 4°C auf einem Rotator inkubiert („*Preclearing*“ des Chromatins).

Anschließend wurde die Sepharose abzentrifugiert (3000rpm, 3min, 4°C), der Chromatitüberstand in frische Reaktionsgefäße überführt und mit Antikörper versetzt. Die verwendeten Antikörper sind in Abschnitt 2.5.2 mit der eingesetzten Menge zusammengefasst. Als Kontrollen für Verunreinigungen dienten Proben ohne Antikörperzugabe.

Die Inkubation erfolgte ü.N. bei 4°C auf einem Rotator. Am nächsten Tag wurde 35µl Protein-A oder Protein-G Sepharose zugegeben und für 1h bei 4°C inkubiert. Durch Zentrifugation (300rpm, 3min, 4°C) wurden die Sepharose *Beads* pelletiert und siebenmal mit Waschpuffer gereinigt. Nach dem letzten Waschen wurde der Waschpuffer mit einer Hamilton Kanüle vollständig von den Sepharose *Beads* entfernt, 250µl Elutionspuffer zugegeben und 30min bei RT eluiert.

Das Eluat wurde anschließend in ein frisches Reaktionsgefäß überführt, mit 10µl 5M NaCl versetzt, mit Mineralöl überschichtet und ü.N. bei 65°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Am nächsten Morgen wurden 4µl Proteinase K (10mg/ml) zugegeben und für weitere 2h bei 55°C inkubiert. Die Aufreinigung erfolgte wie zuvor für die Ladekontrollen beschrieben mit einer Phenol/Chloroform Extraktion und anschließender Säulenaufreinigung.

Nachweis spezifischer DNA Fragmente mit PCR

Der Nachweis spezifischer DNA Fragmente in den Immunpräzipitaten erfolgte durch eine PCR mit promotorspezifischen Oligonukleotiden. Die Sequenzen dieser Oligonukleotide sind in Abschnitt 2.3 aufgeführt. Für die PCR wurden, sofern nicht anders angegeben, 3µl Probe verwendet. Die PCR Bedingungen wurden für jede Reaktion angepasst und optimiert und sind in Tabelle 3.3 zusammengefasst. Folgende Temperaturzyklen wurden gewählt:

(1)	initiale Denaturierung	94°C	3min	
(2)	Denaturierung	94°C	30 sec	
(3)	Hybridisierung	x°C	1min	
(4)	Polymerisation	72°C	1min	zurück zu Schritt 2; 40x
(5)	Endstrangsynthese	72°C	10 min	
(6)	Aufbewahrung	4°C	Pause	

Promotor	Primerpaar	Konz. Magnesium	Hybridisierung
Stag3	SG 296 x SG 297	3mM MgCl ₂	58°C
Smc112	SG 286 x SG 287	2mM MgCl ₂	60°C
4Kb Kontrolle	SG 383 x SG 384	1.5 mM MgCl ₂	55°C
aP-2	SH 77 x SH 78	3 mM MgCl ₂	54°C

Tabelle 3.3: Oligonukleotide und PCR Bedingungen zur Amplifizierung spezifischer Promotorfragmente nach Chromatinimmunpräzitationen

3.7.9 Herstellung von E2F6 Antisera

Zur Herstellung eines spezifischen polyklonalen Antikörpers gegen murines E2F6 wurden im präparativen Maßstab Histidin markiertes E2F6 aufgereinigt und zur Immunisierung von Kaninchen verwendet.

Hierzu wurden kompetente *BL21 Lys* Bakterien mit einem IPTG (Isopropylthio- β -D-galactosid) induzierbaren prokaryotischen Expressionsvektor pRSETA-mE2F6 Vektor transformiert und die E2F6 Expression mit einer SDS Gelelektrophorese und anschließender Coomassie Färbung überprüft.

Für die Aufreinigung wurde eine 50ml Bakterienkultur (*BL21-Lys*, pRSETA-mE2F6) 1:10 in LB/Ampicillin/Chloramphenicol Lösung verdünnt und für 1h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die E2F6 Expression mit 0.125mM IPTG induziert und für 4h bei 37°C inkubiert. Die Bakterien wurden zentrifugiert (4000rpm; 10min; 4°C), der Überstand verworfen und das Pellet in Lysis-Puffer A resuspendiert. Die Lyse der Zellen erfolgte für 15min bei RT. Anschließend wurden Zelltrümmer und nicht lysierte Bakterien durch erneute Zentrifugation (800rpm, 15min, 4°C) pelletiert. Das Lysat wurde zur Bindung des Histidin markierten E2F6 mit 500 μ l Ni-NTA Sepharose *Beads*TM (Quiagen) versetzt und für 30min bei RT auf einem Schüttler inkubiert. Anschließend wurden die Ni-NTA Sepharose *Beads*TM sanft abzentrifugiert (3000rpm, 2min, RT) und zweimal mit je 10ml Puffer A, Puffer B und zweimal mit jeweils 750 μ l Puffer C gewaschen. Die Elution erfolgte durch Zugabe von 1ml Puffer C/ 250mM EDTA und Inkubation für 2min bei RT. Die Sepharose *Beads* wurden durch Zentrifugation aus dem Eluat entfernt dieses bei -80°C aufbewahrt. Die Qualität der Aufreinigung und die Kontrolle der E2F6 Menge in dem Eluat erfolgte mit einer SDS Gelelektrophorese und Coomassie Färbung bzw. einem anschließenden

Western Blot und Nachweis mit einem E2F6 spezifischen E2F6 Antikörper (C10, Herstellung durch Dr. Stefan Gaubatz).

Die Immunisierung der Kaninchen erfolgte durch die Firma Davids (Göttingen). Erhalten wurden zwei Antiseren, die nachfolgend in Immunpräzipitationen (siehe 3.7.7) und Western-Blots (siehe 3.7.6) überprüft wurden.

Anschließend wurde der Antikörper nach einem Standardverfahren affinitätsgereinigt (durchgeführt von Dr. Stefan Gaubatz).

3.8 Die E2f6^{-/-} Maus

Die Mutation und Deletion des murinen E2f6 Gens wurde von Dr. Stefan Gaubatz durchgeführt. Die Strategie hierzu ist in Abbildung 3.1 dargestellt. Mit einem *pPNT* Vektor wurden die Exons 3-5 des E2f6 Gens, die für die DNA Bindungs- und DP-Heterodimerisierungsdomäne von E2F6 kodieren, durch eine Neomycin Resistenzkassette ersetzt. Als negativer Selektionsmarker diente eine HSV-TK (*Herpes-Simplex-Virus-Thymidinkinase*) Kassette. Der Vektor wurde in *I29/Sv J1* embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) durch Elektroporation eingebracht und die Zellen mit G418 (Neomycin) und Gancyclovir selektioniert. ES-Zellklone wurden mit dem *Southern Blot* Verfahren auf die korrekte Rekombination überprüft, anschließend in die Blastozysten von C57/Bl.6 und Balb/C Mäusen injiziert und chimäre Mäuse generiert. Die Nachkommen aus der Zucht dieser Tiere wurden mit einer PCR genotypisiert und damit überprüft, ob der mutierte E2f6 Locus in Keimbahnzellen der chimären Tiere vorliegt. Dadurch wurden E2f6^{+/-} Tiere generiert, die wiederum für die Etablierung einer Mauslinie verwendet wurden.

Die Überprüfung der E2F6 Expression erfolgte zum einen durch eine RNA Expressionsanalyse in primären embryonalen E2f6^{-/-} Fibroblasten mit einem Northern Blot (durchgeführt von Dr. S. Gaubatz). Abbildung 3.1 zeigt, dass keine E2F6 RNA Expression nachgewiesen werden konnte. Mit Hilfe von Immunpräzipitationen aus Proteinlysaten von E2f6^{-/-} Fibroblasten und Kontrollzellen konnte in Einklang mit der fehlenden RNA Expression kein E2F6 Protein detektiert werden (eigene Arbeiten). Somit resultiert die Deletion der für die E2F6 Heterodimerisierungs- und DNA Bindedomäne kodierenden Exons 3-5 im E2f6 Genlocus in einer fehlenden Expression von E2F6, so dass von E2F6 defizienten Mäusen ausgegangen werden kann.

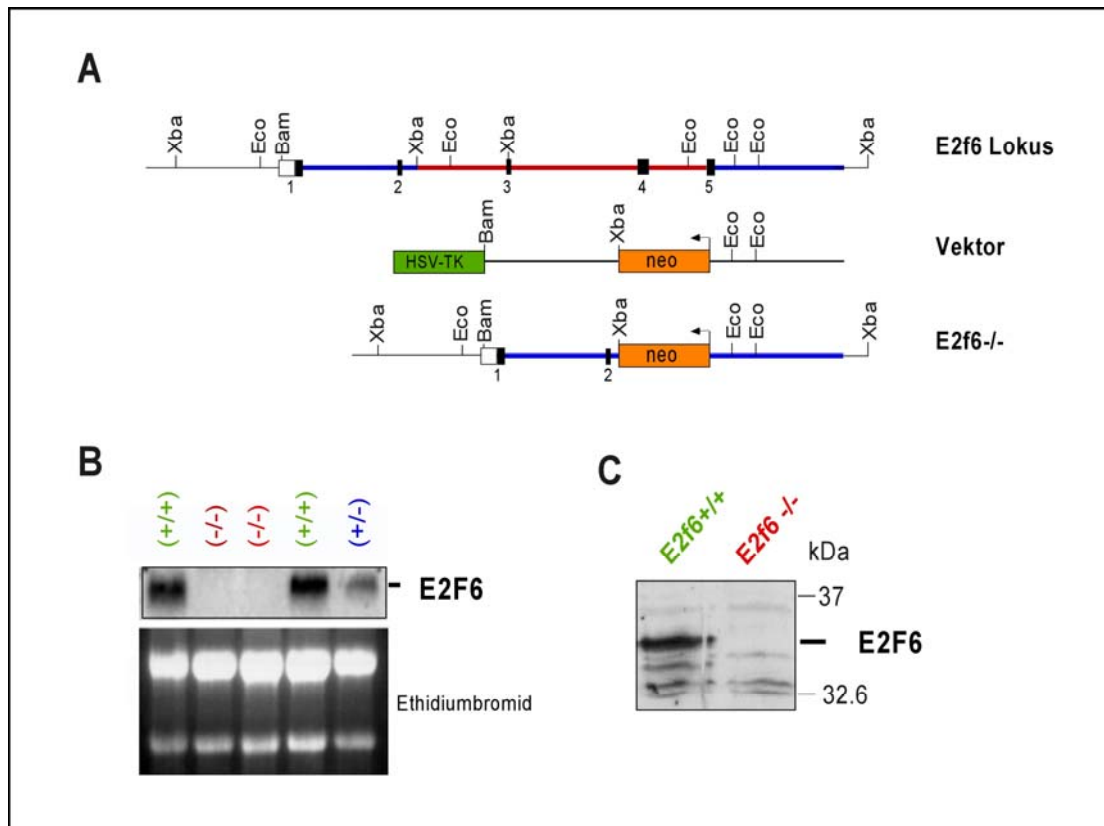


Abbildung 3.1: Die Organisation des E2f6 Genlokus und die E2f6-Knockout-Strategie (A) Die Organisation des E2f6 Genlokus mit den Exons 1-5 (E2f6 Lokus; schwarze Boxen), dem Aufbau des *Knockout*-Vektors (Vektor) und die Organisation des E2f6 Lokus nach korrekter homologer Rekombination des Vektors und Deletion von Exon 3-5 (E2f6^{-/-}). Der mit rote unterlegte Abschnitt des E2f6 Lokus wurde durch das Neomycin Resistenzgen ersetzt (Bam: *Bam*HI, Eco: *Eco*RI, Xba: *Xba*I Restriktionsenzymststellen, neo: Neomycin Resistenzgen, HSV TK: *Herpes Simplex Virus Thymidinkinase* zur negativen Selektion) (B) *Northern Blot* Analyse der E2F6 RNA Expression in murinen embryonalen Fibroblasten. Die Rekombination von Exon 3-5 des E2f6 Genlokus führt zur Deletion der E2F6 RNA Expression (Knockout (-/-); durchgeführt durch Dr. Stefan Gaubatz). (C) E2F6 Immunpräzipitationen und anschließender *Western Blot* aus Proteinlysaten muriner embryonaler Fibroblasten: es konnte kein E2F6 Protein in den Lysaten von E2f6^{-/-} Zellen detektiert und somit die fehlende E2F6 Expression bestätigt werden.

4 Ergebnisse

4.1 Die E2f6^{-/-} Maus

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die physiologische Funktion von E2F6 in der Zellproliferation, Zelldifferenzierung und der Entwicklung untersucht werden.

Hierzu wurden transgene Mäuse verwendet, in denen die Exons 3-5 des murinen E2F6 Genlokus durch eine Neomycin Resistenzkassette ersetzt wurden. Dadurch wurde die E2F6 Heterodimerisierungs- und DNA Bindedomäne deletiert. Dies resultiert in einer fehlenden Expression von E2F6, wie durch RNA- und Proteinexpressionsanalysen von embryonalen Fibroblasten gezeigt werden konnte (siehe 3.8 und Abbildung 3.1).

Da genetische Variationen zwischen verschiedenen Inzuchtmausstämmen den Phänotyp transgener Mäusen beeinflussen können, wurden E2f6^{+/-} ES-Zellen in die Blastozysten sowohl von C57/Bl.6 als auch von Balb/C Weibchen injiziert. Die dadurch gewonnenen chimären Tiere wurden für die Bildung einer Kolonie transgener C57/Bl.6 und Balb/C Mäuse verwendet (siehe 3.8).

4.1.1 E2F6 defiziente Mäuse sind lebensfähig

E2f6 heterozygote Mäuse sind lebensfähig und standen zu Beginn dieser Arbeit zur Verfügung. Die Verpaarung von E2f6^{+/-} Mäusen und eine anschließende Genotypisierung der Nachkommen aus diesen Kreuzungen mit Hilfe einer PCR (*Polymerase Chain Reaction*) zeigte, dass E2f6^{-/-} Mäuse in einer nach den Mendelschen Vererbungsgesetzen erwarteten Häufigkeit geboren werden. Diese Häufigkeit war unabhängig vom verwendeten Mausstamm (siehe Tabelle 4.1). Da E2F6 defiziente Mäuse lebensfähig sind, scheint E2F6 keine essentielle Funktion während der Embryonalentwicklung einzunehmen.

<u>C57/Bl.6</u>	Genotyp	nachgewiesen	erwartet
	+/+	32 (0.28)	35 (0.25)
	+/-	73 (0.52)	70 (0.5)
	-/-	35 (0.25)	35 (0.25)
	140 (1.0)		

<u>Balb/C</u>	Genotyp	nachgewiesen	erwartet
	+/+	60 (0.26)	57.5 (0.25)
	+/-	118 (0.51)	115 (0.5)
	-/-	52 (0.23)	57.5 (0.25)
	230 (1.0)		

Tabelle 4.1: E2f6^{-/-} Mäuse sind lebensfähig und werden in der nach Mendel erwarteten Häufigkeit geboren

E2f6^{+/-} Tiere aus dem C57/Bl.6 und aus dem Balb/C Maus-Inzuchtstämmen wurden verpaart und der Genotyp der Nachkommen mit einer PCR festgestellt. Die Tabelle zeigt die Anzahl der Tiere mit dem E2f6^{+/+}, E2f6^{+/-} und dem E2f6^{-/-} Genotyp. Die nach den Mendelschen Vererbungsgesetzen erwarteten bzw. die beobachteten Häufigkeiten für jeden dieser Genotypen sind in Klammern dargestellt.

Die postnatale Größen- und Gewichtsentwicklung von E2f6^{-/-} Tieren waren normal. In Tabelle 4.2 ist exemplarisch die Gewichtsentwicklung von weiblichen 6 bzw. 8 Wochen alten Balb/C Mäusen in Abhängigkeit vom Genotyp dargestellt.

Genotyp	Alter	
	6 Wochen	10 Wochen
+/+	16.5 \pm 0.8 (n=4)	18.9 \pm 1.2 (n=3)
+/-	15.8 \pm 0.9 (n=4)	21.0 \pm 1.9 (n=5)
-/-	15.8 \pm 1.2 (n=3)	20.3 \pm 2.1 (n=4)

Tabelle 4.2: Die postnatale Gewichtsentwicklung von Balb/C Mäusen ist normal

E2f6^{+/-} Tiere aus dem Balb/C Maus-Inzuchtstamm wurden verpaart und die aus diesen Kreuzungen hervorgehenden Nachkommen mit einer PCR genotypisiert. Nach 6 bzw. nach 10 Wochen wurde das Gewicht der weiblichen Jungtiere bestimmt. Die Anzahl der untersuchten Tiere für jeden Genotyp ist in Klammern angegeben.

Das äußere Erscheinungsbild E2F6 defizienter Mäuse im Vergleich zu Kontrolltieren war unauffällig (siehe Abbildung 4.1). E2F6 defiziente Tiere erreichten außerdem das für La-

bormäuse übliche Alter von ca. 2 Jahren (siehe 2.1.1.1). Innerhalb dieses Zeitraums konnte keine außergewöhnlichen Erkrankungen von E2f6^{-/-} Tieren im Vergleich zu einer Kolonie von Kontrolltieren beobachtet werden.

Um zu untersuchen, ob E2F6 defiziente Mäuse fruchtbar sind, wurden E2f6^{-/-} Tiere miteinander verpaart. Die Wurfgröße aus diesen Verpaarungen entsprach der erwarteten Anzahl von 4-8 Jungtieren (siehe 2.1.1.1). Die Nachkommen aus diesen Verpaarungen waren gesund und zeigten ebenfalls eine normale, unauffällige postnatale Größen- und Gewichtsentwicklung.

Aus diesen ersten Untersuchungen geht somit hervor, dass E2F6 weder für die Embryonalentwicklung noch für die postnatale Entwicklung der Maus notwendig ist.

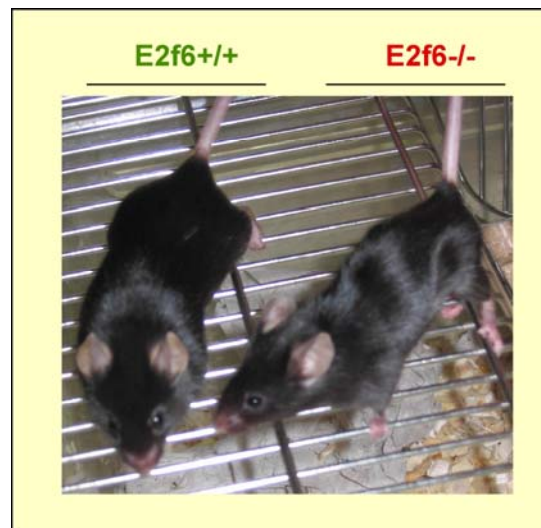


Abbildung 4.1: E2F6 defiziente Tiere zeigen ein unauffälliges äußeres Erscheinungsbild

Dargestellt sind 3 Monate alte männliche Mäuse, die aus dem gleichen Wurf stammen. Es sind keine äußeren Unterschiede zwischen E2f6^{-/-} und E2f6^{+/+} Mäusen erkennbar.

4.1.2 E2f6^{-/-} Mäuse zeigen einen Defekt in der Spermatogenese

Wie zuvor geschildert, sind E2f6^{-/-} Mäuse lebensfähig und fruchtbar. Damit sind jedoch Defekte in der Struktur und der Funktion einzelner Organe noch nicht definitiv auszuschließen.

Um dies zu untersuchen, wurden aus zwei männlichen 2-3 Monate alten E2f6^{-/-} Mäusen und einem Kontrolltier Lunge, Herz, Leber, Pankreas, Milz, Magen, Thymus, Niere, Hoden, Skelettmuskulatur, Gehirn, Duodenum und Kolon entnommen. Diese Organe wurden

mit Carnoy Lösung fixiert, in Alkohol entwässert und in Paraffin eingebettet. Anschließend wurden Schnitte von diesen Organen angefertigt und mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt (siehe 3.4.1).

Im Rahmen dieser histologischen Untersuchung konnte ein Defekt in der Spermatogenese E2F6 defizienter Männchen festgestellt werden (Abbildung 4.2). In den *Tubuli Seminiferi* von E2f6^{-/-} Männchen befanden sich signifikant weniger reife Spermatozoen im Vergleich zur Wildtyp Kontrolle. Gleichzeitig war das Lumen der Tubuli mit einem eosinophilen Material gefüllt. Dies ist möglicherweise durch die Akkumulation von Zelltrümmern im Lumen des Tubulus zu erklären. Das Interstitium des Hodens zeigte eine auffällige Akkumulation von Leydig-Zellen. Damit einhergehend zeigte sich, dass der Nebenhoden (*Ductus Epididymidis*) von E2f6^{-/-} Tieren im Vergleich zu E2f6^{+/+} Kontrollen nur partiell mit reifen Spermatozoen gefüllt waren (Abbildung 4.2).

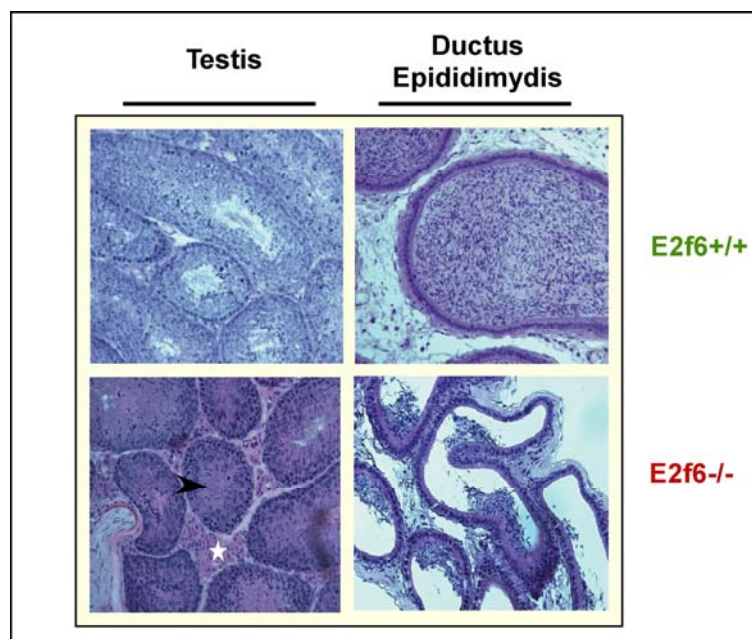
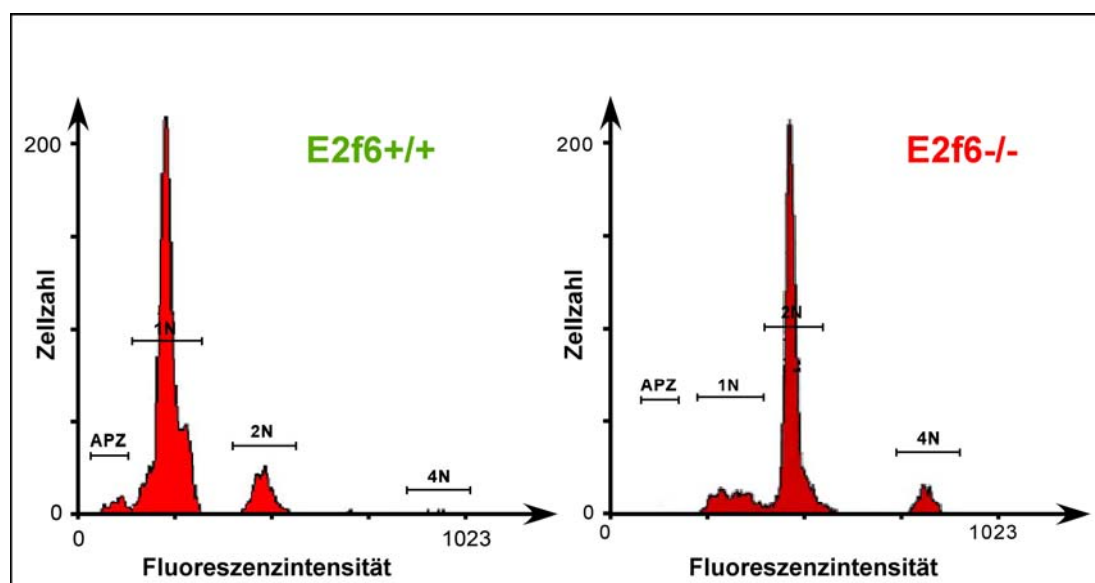


Abbildung 4.2: E2F6 defiziente Tiere zeigen einen Defekt in der Spermatogenese

Die Hoden von 2-3 Monate alten E2f6^{-/-} und E2f6^{+/+} Männchen wurden präpariert, histologische Präparate angefertigt und mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt. Die *Tubuli Seminiferi* aus E2f6^{-/-} Männchen zeigen weniger reife Spermatozoen als die E2f6^{+/+} Kontrollen und sind mit einem eosinophilen Material gefüllt (Pfeil). Das Interstitium weist eine erhöhte Anzahl an Leydig-Zellen im Vergleich zur Kontrolle auf (*). Der *Ductus Epididymidis* von E2f6^{-/-} Mäusen ist nur wenig mit reifen Spermatozoen gefüllt.

Weitere Untersuchungen in Zusammenarbeit mit José Barbero (Madrid) unterstützen die histologische Beobachtung eines Defektes in der Spermatogenese von E2f6^{-/-} Mäusen:

Die intratubulären Zellen der Hoden einer E2f6^{-/-} und einer Kontrollmaus wurden isoliert und Sertoli Zellen, primäre und sekundäre Spermatozyten sowie Spermatisden angereichert. Diese Zellpopulation wurde mit einem Durchflußzytometer nach ihrem DNA Gehalt aufgetrennt. Hierbei wurde in E2f6^{-/-} Tieren im Vergleich zur Wildtyp Kontrolle eine signifikante Reduktion der Zellen mit einem einfachen DNA Gehalt (1N; Spermatisden) detektiert. Gleichzeitig akkumulierten Zellen mit diploiden und tetraploiden (2N, 4N; Spermatozyten) Chromosomensatz (Abbildung 4.3).



Genotyp	4N	2N	1N	APZ
E2f6 ^{+/+}	1.8	12.3	<u>78.3</u>	5.3
E2f6 ^{-/-}	10.0	63.5	<u>12.1</u>	2.0

Abbildung 4.3: Die Anzahl reifer Spermatisden in den Tubuli Seminiferi von E2f6^{-/-} Männchen ist reduziert

Die Hoden von 6 Monate alten E2f6^{-/-} und E2f6^{+/+} Männchen wurden präpariert und Sertoli Zellen, primäre und sekundäre Spermatozyten sowie Spermatisden angereichert. Der DNA Gehalt dieser Zellen wurde durchflußzytometrisch bestimmt und die jeweilige Anzahl in einem Histogramm dargestellt und quantifiziert. In E2f6^{-/-} Hoden war eine deutlich reduzierte Anzahl von Zellen mit einem einfachen (1N) DNA Gehalt zu beobachten. (APZ: apoptotische Zellen; 1N: einfacher DNA Gehalt, 2N zweifacher DNA Gehalt; usw.)

Somit konnte auf zellulärer Ebene der histologische Befund eines Spermatogenesedefektes bestätigt werden. Es sind jedoch weitere detaillierte Untersuchungen notwendig, um den Defekt in der Spermatogenese E2F6 defizienter Mäuse zu charakterisieren. Es sollte abschließend erwähnt werden, dass E2f6^{-/-} Männchen fruchtbar sind (Abschnitt 4.1.1). Je-

doch muss bei Mäusen die Spermatogenese um 90% reduziert werden, bis ein Effekt auf die Fertilität beobachtet werden kann (Russell *et al.*, 1990).

Alle anderen untersuchten Organe von E2f6^{-/-} Mäusen zeigten eine normale Morphologie.

4.2 Untersuchungen E2F6 defizienter Fibroblasten

Da E2F6 der Familie der E2F Transkriptionsfaktoren zugeordnet wird und verschiedene Studien Evidenz für eine Funktion von E2F6 im Zellzyklus lieferten (Cartwright *et al.*, 1998; Gaubatz *et al.*, 1998; Ogawa *et al.*, 2002), sollte als nächstes die Proliferation und das Wachstum E2F6 defizienter Zellen untersucht und charakterisiert werden.

4.2.1 E2F6 defiziente murine embryonale Fibroblasten wachsen normal

Um die Funktion von E2F6 in der Regulation der Zellproliferation zu untersuchen, wurde zunächst das Wachstum E2F6 defizienter primärer embryonaler Fibroblasten analysiert. Dabei handelt es sich um primäre Zellen, die aus 13.5 Tage alten Embryonen isoliert werden und für eine kurze Zeit *in-vitro* kultiviert werden können.

Zur Gewinnung dieser Zellen wurden E2f6^{+/-} Tiere verpaart und der Zeitpunkt der Befruchtung durch eine *Plug*-Kontrolle bestimmt (siehe 3.1.2). Nach 13.5 Tagen wurden die Embryonen aus dem Uterus präpariert, das blutbildende Gewebe entfernt und Fibroblasten aus dem Restgewebe des Embryos isoliert (siehe 3.2.1). Der Kopf der Embryonen wurde während der Präparation abgetrennt, das Gewebe enzymatisch verdaut und anschließend mit einer PCR genotypisiert (siehe 3.5.1.2 und 3.5.1.5). Auf diese Weise konnte der E2f6 Genotyp der isolierten Fibroblasten bestimmt werden.

Durch die asynchrone Entwicklung der Embryonen entstehen geringe Variationen im Proliferationsverhalten der aus den Embryonen isolierten Fibroblasten. Daher wurden für die folgenden Analysen jeweils drei verschiedene E2f6^{-/-} bzw. E2f6^{+/+} Fibroblastenklone verglichen.

Die E2f6^{-/-} und die Kontrollzellen wurden jeweils in 24 Loch Platten ausgesät (Passage-2; P-2) und zu den angegebenen Zeitpunkten mit einer Formalinlösung fixiert. Anschließend wurden die fixierten Zellen mit Kristallviolett gefärbt, das als kationischer Farbstoff an Nukleinsäuren und saure Polysaccharide bindet. Die Intensität dieser Färbung bildet dabei ein relatives Maß für die Anzahl der fixierten Zellen. Um die Färbung zu quantifizieren,

wurde das Kristallviolett mit einer 10%igen Essigsäurelösung extrahiert und die optische Dichte (OD) dieses Extraktes mit einem *ELISA Reader* bestimmt (siehe 3.2.7). Die OD ist in Abbildung 4.4 in Abhängigkeit von der Dauer der Kultivierung der Fibroblasten dargestellt. Das Wachstumsverhalten E2F6 defizienter Zellen wurde zum einen unter Standardbedingungen mit 10% Serum, zum anderen unter serumarmen Bedingungen mit 2% Serum bestimmt. Jedoch war kein Wachstumsunterschied von E2f6^{-/-} Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen in einem Zeitraum von 5 Tagen erkennbar. Somit kann zunächst geschlossen werden, dass das Fehlen von E2F6 die Proliferation primärer Fibroblasten nicht zu beeinträchtigen scheint.

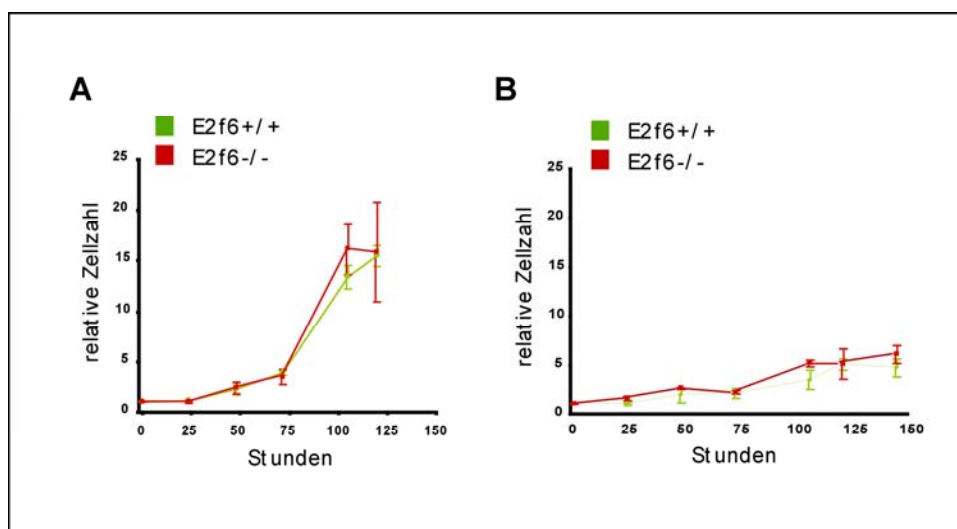


Abbildung 4.4: E2f6^{-/-} Fibroblasten proliferieren normal

Je drei verschiedene E2f6^{-/-} und E2f6^{+/+} Fibroblastenklone wurde in 24 Loch Platten ausgesät und unter (A) Standard (10% Serum) bzw. (B) serumarmen Bedingungen (2% Serum) kultiviert. Nach definierten Zeitpunkten wurden die Zellen fixiert und mit Kristallviolett gefärbt. Der Farbstoff wurde extrahiert, die optische Dichte (OD) bestimmt, ins Verhältnis zur Referenz (OD nach 0h) gesetzt und graphisch dargestellt. Die OD bildet somit ein relatives Maß für die Anzahl der Zellen.

4.2.2 E2F6 defiziente Fibroblasten zeigen eine normale Zellzyklusverteilung

In Ergänzung zu der Untersuchung des Wachstumsverhaltens wurde die Verteilung der Zellzyklusphasen in asynchron wachsenden E2F6 defizienten embryonalen Fibroblasten mit einem Durchflußzytometer bestimmt und mit Kontrollzellen verglichen.

Hierzu wurden erneut drei verschiedene E2F6 defiziente Fibroblastenklone bzw. Kontrollzellen ausgesät (P-2) und bis zu einer Dichte von 70%-80% unter Standardbedingungen

kultiviert. Anschließend wurden die Zellen von der Kulturschale mit Trypsin gelöst, mit 70% Ethanol fixiert und die DNA mit dem DNA-interkalierenden Farbstoff Propidiumiodid (PI) gefärbt (siehe 3.2.8). Fibroblasten mit einem einfachen DNA Gehalt (1N; G0/G1 Zellen) werden dabei weniger stark durch das Propidiumiodid angefärbt als Zellen mit einem doppelten DNA Gehalt (2N; G2/M Zellen). Mit Hilfe eines Durchflußzytometers (*Fluorescence activated cell-sorter; FACS*) wurde die Fluoreszenzemission des PI für einzelne Zellen bestimmt. Die Intensität der Emission korreliert mit dem DNA Gehalt der Zellen. Somit konnten die E2F6 defizienten Fibroblasten durchflußzytometrisch aufgetrennt, ihr DNA Gehalt quantifiziert und die Zellzyklusphase bestimmt werden.

Verschiedene Kulturen von E2f6^{-/-} Fibroblasten zeigten eine zu den Kontrollzellen identische Verteilung über die G1, S und G2 Phase im Zellzyklus (Abbildung 4.5).

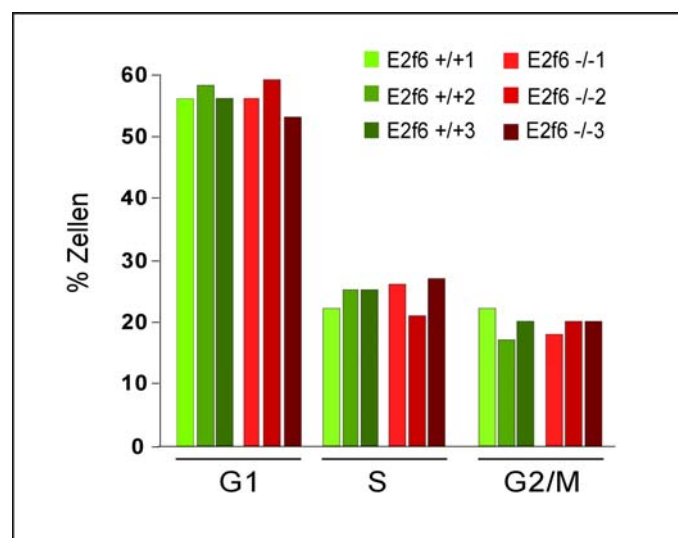


Abbildung 4.5: E2f6^{-/-} Fibroblasten zeigen eine normale Zellzyklusverteilung

Je drei verschiedene E2f6^{-/-} und E2f6^{+/+} Fibroblastenklone (P-3) wurden in subkonfluenter Dichte isoliert. Die Anzahl der Zellen in einer bestimmten Zellzyklusphase wurde durchflußzytometrisch bestimmt, quantifiziert und graphisch dargestellt. Es waren keine Unterschiede in der Verteilung asynchron wachsender E2f6^{-/-} Zellen über die G1, S und G2/M Phase des Zellzyklus im Vergleich zu E2f6^{+/+} Zellen zu erkennen.

Diese Beobachtung war vor dem Hintergrund der zuvor beschriebenen normalen Proliferation E2F6 defizienter Fibroblasten zu erwarten und beide Ergebnisse stehen im Einklang mit der normalen Entwicklung E2F6 defizienter Mäuse. Es konnte somit keine Evidenz für eine Funktion von E2F6 in der Regulation der Zellproliferation und des Zellwachstums erhalten werden.

4.2.3 E2F6 defiziente Fibroblasten kehren aus der G0 Phase mit einer normalen Kinetik in den Zellzyklus zurück

Eine Überexpression von E2F6 in NIH3T3 Zellen resultiert in einem verzögerten Wiedereintritt der Zellen in den Zellzyklus nach Serumentzug (Gaubatz *et al.*, 1998). Ogawa *et al.* beschrieben einen E2F6 Proteinkomplex, der spezifisch in der G₀ Phase des Zellzyklus auf den Promotoren E2F regulierter Gene nachweisbar war (Ogawa *et al.*, 2002). Daher sollte untersucht werden, ob E2F6 eine Funktion in der G₀ Phase des Zellzyklus hat.

Hierzu wurden E2F6 defiziente embryonale Fibroblasten ausgesät (P-2), passagiert und anschließend für 72h in Hungermedium kultiviert. Primäre Zellen arretieren unter diesen Umständen den Zellzyklus und werden quieszent (G₀). Nach 72 Stunden wurden die Zellen durch die Zugabe von Vollmedium synchron in den Zellzyklus zurückgeführt (siehe 3.2.4). Um spezifisch den Anteil der Zellen bestimmen zu können, die in der Replikationsphase (S-Phase) sind, wurden die Zellen 1h vor der Fixierung mit BrdU (5'**B**romo-2'**D**eoxyUridine) versetzt. BrdU ist ein Nukleotidanalogue, das während der S-Phase in die DNA inkorporiert wird. Nach Fixierung der Zellen kann das BrdU durch einen mit FITC (Fluoreszein-Iso-Thio-Cyanat) gekoppelten Antikörper markiert werden (siehe 2.5.1). Die Fluoreszenzemission des FITC wird anschließend durchflußzytometrisch bestimmt. Die Intensität der Emission korreliert mit dem BrdU Gehalt und damit mit dem Anteil an Zellen, die sich in der Replikationsphase des Zellzyklus befinden. Zunächst konnte festgestellt werden, dass E2F6 defiziente Zellen durch Serumentzug im Zellzyklus arretiert werden können. Gleichzeitig konnte beobachtet werden, dass E2F6 defiziente Zellen nach Serumzugabe die G₀ Phase mit der gleichen Kinetik wie entsprechende Kontrollzellen verlassen (siehe Abbildung 4.6).

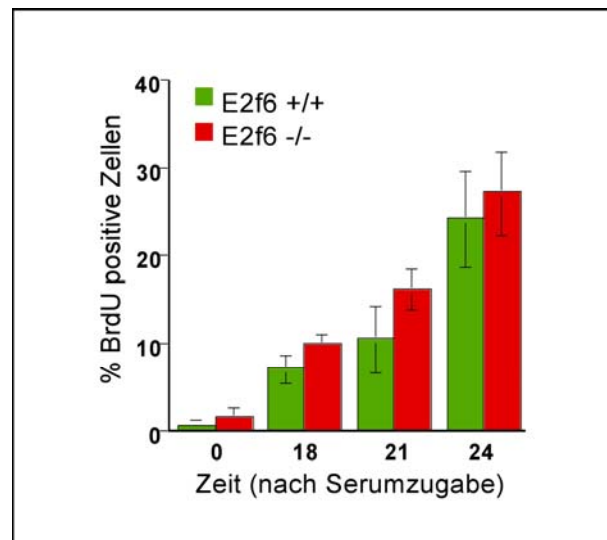


Abbildung 4.6: E2f6^{-/-} Fibroblasten treten mit einer normalen Kinetik aus der G0 Phase in den Zellzyklus zurück

Je drei verschiedene E2f6^{-/-} und E2f6^{+/+} Fibroblastenklone (P-3) wurden durch Serumentzug in der G0 Phase arretiert. Durch anschließende Serumzugabe nach 72h wurde synchron die G1/S Phase induziert. Die Zellen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten mit BrdU behandelt. Das von den Zellen während der S-Phase in die DNA inkorporierte BrdU wurde durchflußzytometrisch durch einen FITC (Fluoreszein-Iso-Thio-Cyanat) gekoppelten Antikörper detektiert und dadurch spezifisch der Anteil an Zellen, die zum Zeitpunkt der Fixierung in der S-Phase waren, ermittelt, quantifiziert und graphisch dargestellt.

Somit konnten entgegen der zuvor erwähnten Evidenz für eine Funktion von E2F6 in der G0 Phase unter den hier gewählten experimentellen Bedingungen keine Hinweise erhalten werden, dass E2F6 eine Funktion in der G0 Phase des Zellzyklus hat.

4.2.4 Die Induktion von replikativer und onkogener Seneszenz in E2F6 defizienten Fibroblasten ist normal

E2F6 interagiert *in-vitro* mit dem Bmi1 Polycomb Protein (Trimarchi *et al.*, 2001). Bmi1 reguliert die Expression von p16^{INK4a} und p19^{ARF} durch Inhibition des *INK4a/ARF* Lokus. Im Einklang damit exprimieren Bmi1 defiziente Fibroblasten verstärkt p16^{INK4a} und p19^{ARF}, arretieren nach wenigen Zellteilungen im Zellzyklus und werden seneszent (Jacobs *et al.*, 1999). Um zu untersuchen, ob E2F6 durch die Interaktion mit Bmi1 an der Regulation des *INK4a/ARF* Lokus beteiligt ist, sollte die Induktion der Seneszenz in E2f6^{-/-} Fibroblasten analysiert werden.

Hierzu wurden E2f6^{-/-} Fibroblasten und Wildtyp Kontrollen ausgesät (P-2) und nach einem 3T3 Protokoll passagiert. Bei jeder Passage wurden die absolute Zellzahl bestimmt und in Abhängigkeit von der Passage dargestellt (siehe 3.2.3). Dabei konnte beobachtet werden, dass E2f6^{-/-} Fibroblasten nach etwa 5-6 Passagen im Zellzyklus arretieren und morphologische Charakteristika einer replikativen Seneszenz zeigen (vergrößertes und flach verzweigtes Zytoplasma). Dies entspricht der in den Kontrollzellen beobachteten Kinetik der Seneszenzinduktion (Abbildung 4.7 (A)).

In Ergänzung dazu wurde die Expression von p16^{INK4a} und p19^{ARF} überprüft. Hierzu wurden aus jeweils zwei E2f6^{-/-} und E2f6^{+/+} Fibroblastenklonen (P-3) die Gesamt-RNA isoliert und die p16^{INK4a} und p19^{ARF} Expression mit einer RT-PCR semiquantitativ analysiert (siehe 3.5.2.1 und 3.6.1). Im Einklang mit der normalen Induktion der replikativen Seneszenz in E2f6^{-/-} Fibroblasten wurde keine erhöhte p16^{INK4a} oder p19^{ARF} Expression beobachtet (Abbildung 4.7 (B)).

Somit konnte keine Evidenz für eine Funktion von E2F6 in der Induktion der replikativen Seneszenz erhalten werden.

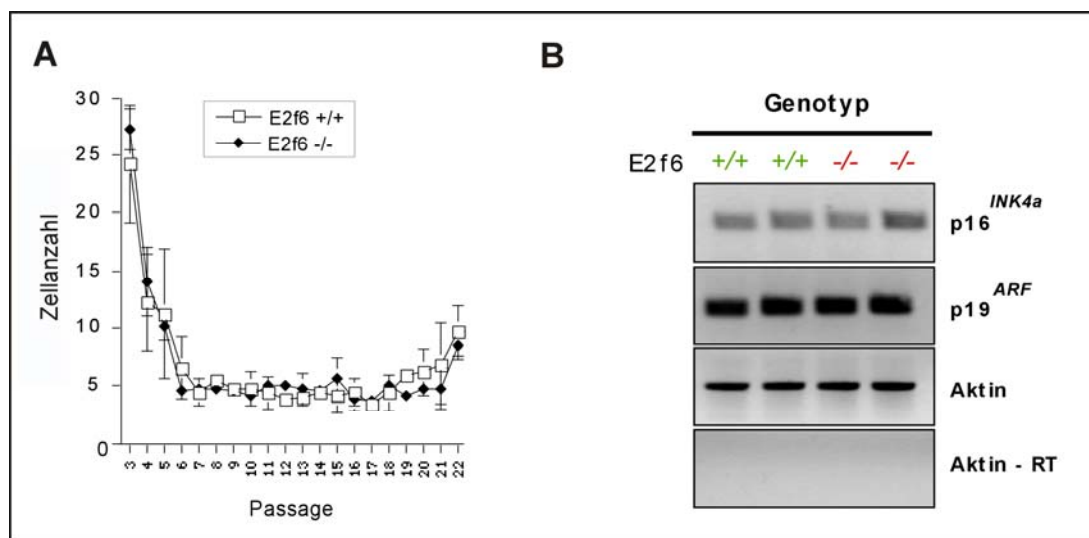


Abbildung 4.7: E2f6^{-/-} Zellen zeigen eine normale Induktion der replikativen Seneszenz

(A) Je drei verschiedene E2f6^{-/-} und E2f6^{+/+} Fibroblastenklone wurden nach einem 3T3 Protokoll passagiert. Bei jeder Passage wurde die absolute Zellzahl bestimmt und in Abhängigkeit von der Passage graphisch dargestellt. Durch die Induktion der replikativen Seneszenz nahm die Anzahl der E2f6^{-/-} Zellen identisch zu den Kontrollzellen nach wenigen Passagen deutlich ab. (B) Aus je zwei verschiedenen E2f6^{-/-} und E2f6^{+/+} Fibroblastenklonen wurde Gesamt-RNA isoliert, cDNA synthetisiert und mit einer PCR die Expression von p16^{INK4a} und p19^{ARF} semiquantitativ analysiert. Dabei konnte keine deregulierte Expression von p16^{INK4a} und p19^{ARF} in E2f6^{-/-} Zellen beobachtet werden.

Eine charakteristische Eigenschaft primärer Zellen ist die Arretierung im Zellzyklus nach einer konstitutiven Stimulation der Zellproliferation durch ein Onkogen (onkogene Seneszenz). Um eine Funktion von E2F6 in dieser onkogenen Seneszenz zu überprüfen, wurde mit Hilfe einer retroviralen Infektion eine konstitutiv aktive Form des *Ras* Onkoproteins (*RasV12*) in primären embryonalen Fibroblasten exprimiert (siehe 3.3.3). Anschließend wurden die Fibroblasten in einer Dichte von 1×10^4 Zellen auf 10cm Kulturschalen ausgesät und ohne weitere Passagierung unter Selektionsbedingungen über 10 Tage kultiviert. Durch die abschließende Färbung der Zellen mit Kristallviolett, konnte das Wachstum der Zellen quantifiziert werden (siehe 3.2.10). Dabei wurde ein Arrest E2F6 defizienter Zellen im Zellzyklus in Antwort auf die Überexpression des konstitutiv aktiven Ras Onkoproteins beobachtet (Abbildung 4.8). Dieser Arrest war identisch zu dem Wachstumsstopp der Kontrollzellen. Aufgrund dieses normalen Zellzyklusarrests E2F6 defizienter Zellen in Antwort auf die onkogene Wachstumsstimulation ist zu vermuten, dass E2F6 keine Funktion in der Regulation der onkogenen Seneszenz hat.

Zusammengefasst konnte somit keine Evidenz für eine funktionelle Interaktion von E2F6 mit Bmi-1 in der Induktion der replikativen oder onkogenen Seneszenz erhalten werden.

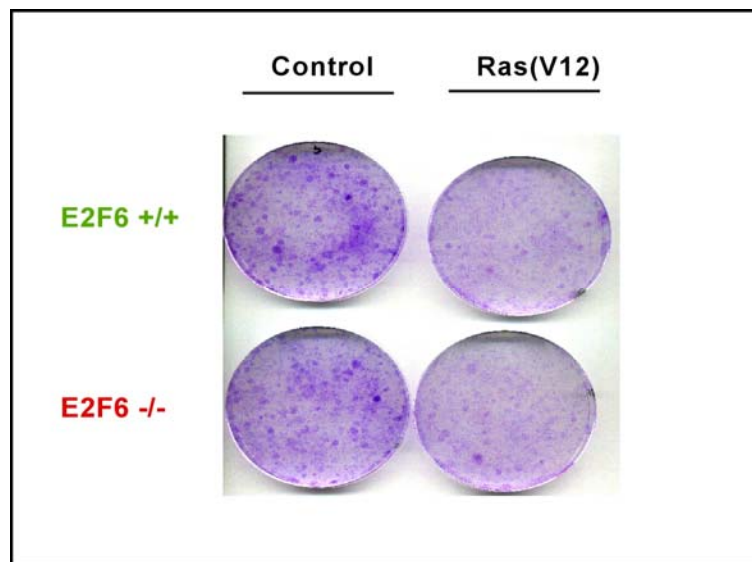


Abbildung 4.8: E2f6^{-/-} Fibroblasten induzieren einen Wachstumsarrest nach Überexpression eines Onkoproteins

E2f6^{-/-} Zellen und E2f6^{+/+} Zellen (P-3) wurden mit einer konstitutiv aktiven Mutante des *Ras* Onkoproteins (*RasV12*) infiziert, subkonfluent ausgesät, für 10 Tage unter Selektionsbedingungen kultiviert und mit Kristallviolett gefärbt. E2f6^{-/-} Zellen reagieren auf die Überexpression von *Ras(V12)*, identisch zu den Kontrollzellen, mit einem Wachstumsarrest.

4.3 Der Skelettphänotyp E2F6 defizienter Mäuse

In zwei unabhängigen Studien konnte die Interaktion von E2F6 mit Polycomb Proteinen gezeigt werden (Trimarchi *et al.*, 2001; Ogawa *et al.*, 2001). Polycomb Proteine bilden Multiproteinkomplexe, die eine Expression homeotischer Gene (Hox Gene) während der Embryonalentwicklung und in adulten Zellen stabil inhibieren (Jacobs und van Lohuizen, 2002; siehe 1.4.2.1). Polycomb defiziente Mäuse zeigen neben anderen Phänotypen posteriore homeotische Transformationen, d.h., ein Segment der antero-posterioren Achse zeigt die charakteristische Morphologie eines weiter kaudal lokalisierten Segmentes (Bateson, 1894; Veraksa *et al.*, 2000). Diese posterioren homeotischen Transformationen Polycomb defizienter Mäuse korrelieren mit einer Verschiebung der anterioren Expressionsgrenzen spezifischer Hox Gene.

4.3.1 Posteriore homeotische Transformationen in E2F6 defizienten Mäusen

Um die Interaktion von Polycomb Proteinen mit E2F6 *in-vivo* zu untersuchen, sollten zunächst die Skelette E2F6 defizienter Mäuse analysiert werden.

Hierzu wurden zunächst die Skelette von zwei adulten E2f6^{-/-} Tieren und einem E2f6^{+/+} Kontrolltier mit einem Röntgenbild dargestellt. Wie in Abbildung 4.9 zu erkennen ist, zeigen E2F6 defiziente Tiere einen normalen Aufbau des Skelettes.

Die antero-posteriore Achse der Maus gliedert sich in sieben Halswirbelkörper (C1-C7), dreizehn Thorakalwirbel (T1-T13), sechs Lumbalwirbel (L1-L6), vier Sakralwirbelkörper (S1-S4) und einer variablen Anzahl von Kaudalwirbeln. Die sorgfältige Analyse der Wirbelkörper führte zu der Beobachtung, dass der sechste Lumbalwirbel (L6) E2F6 defizienter Mäuse eine veränderte Morphologie in Form der Bildung einer einseitigen sakroiliakischen Verbindung zeigte. Die Wirbelkörper L1-L5 erschienen dagegen normal (Abbildung 4.9).

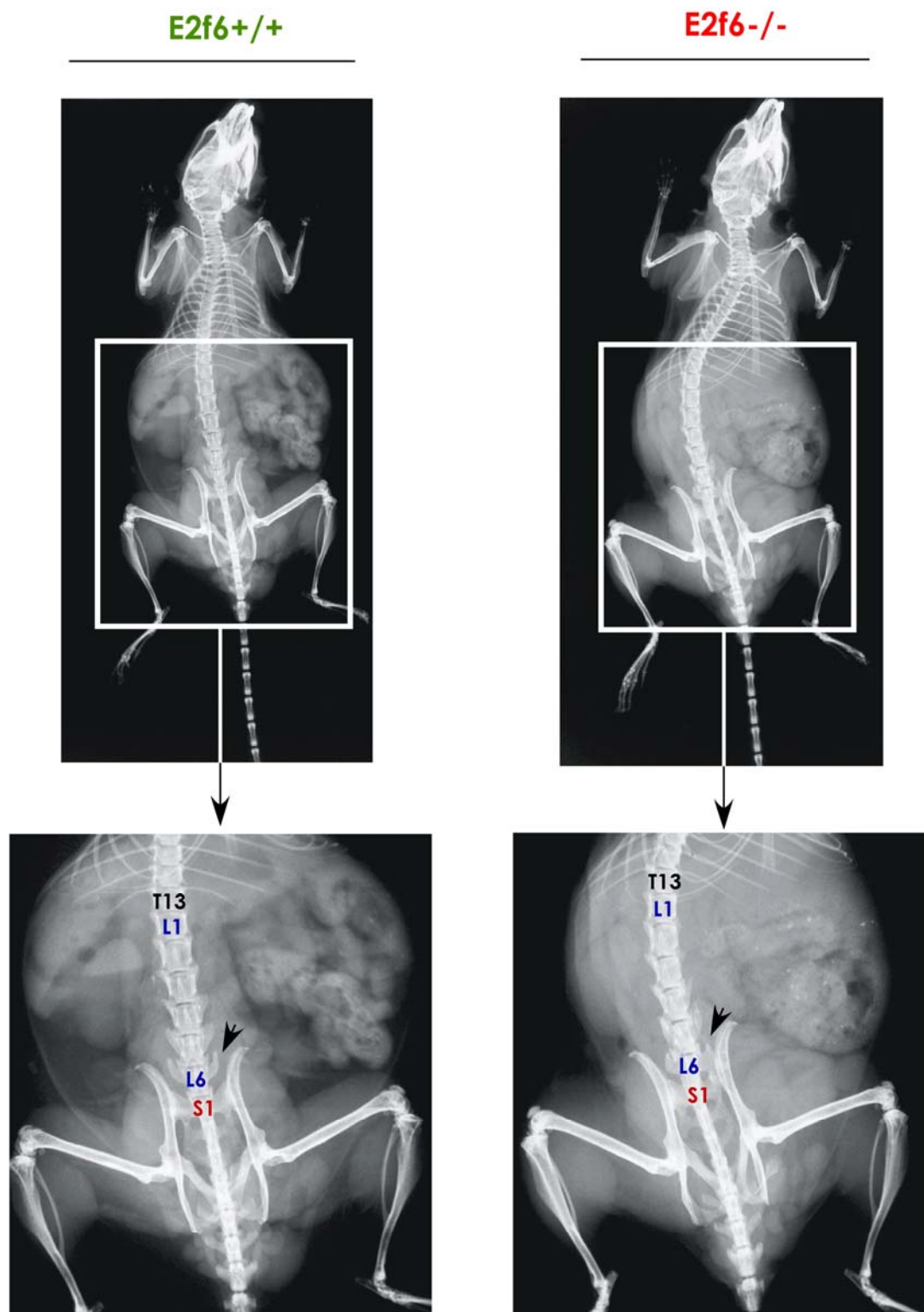


Abbildung 4.9: Veränderte Morphologie des 6. Lumbalwirbels einer E2f6^{-/-} Maus
 Von einer E2f6^{-/-} und einer Kontrollmaus wurden von ventral ein Röntgenbild des Skelettes angefertigt. Der thorako-lumbo-sakrale Bereich der Wirbelsäule ist vergrößert dargestellt. Der dreizehnte Thorakalwirbel (T13), der erste und der sechste Lumbalwirbel (L1 und L6) sowie der erste Sakralwirbel (S1) sind markiert. L6 zeigt in der hier dargestellten E2f6^{-/-} Maus eine einseitige sakro-iliakische Verbindung (Pfeil).

Um diese Beobachtung mit einer größeren Anzahl an Tieren zu bestätigen, wurden Skelettpräparationen und Skelettfärbungen von 16.5 Tage alten Embryonen und von neugeborenen Mäusen durchgeführt. Zu diesen Zeitpunkten ist das Skelett bereits entwickelt, ist technisch gut zu präparieren und es können Ossifikationszentren des Skelettes dargestellt und untersucht werden. Die Knochenanteile der freipräparierten Skelette wurden mit Alizarin-Rot, die Knorpelanteile mit Alcian-Blau eingefärbt (siehe 3.4.3). Die Genotypisierung der Tiere erfolgte durch eine Gewebebiopsie aus dem Schwanz und einer nachfolgenden PCR (siehe 3.5.1.2 und 3.5.1.4).

Eine Gesamtdarstellung der gefärbten Skelette zeigt Abbildung 4.10 (A). Die Skelette E2F6 defizienter Tiere erscheinen zunächst normal in Aufbau und Gliederung. Abbildung 4.10 (B) zeigt den thorako-lumbalen Bereich des Skelettes von zwei E2f6^{-/-} Mäusen und einer Kontrollmaus. Die genaue Analyse und Auszählung bestätigte den zuvor anhand der Röntgenbilder gestellten Befund einer veränderten Wirbelsegmentierung im Lumbalbereich der Wirbelsäule. An den Seiten des sechsten Lumbalwirbelkörpers sind sakroiliakische Verbindungen zu erkennen. Diese werden sowohl einseitig als auch an beiden Seiten des Wirbels gebildet. Somit zeigt der sechste Lumbalwirbel der E2f6^{-/-} Mäuse die charakteristische Morphologie des ersten Sakralwirbels. Diese Segmentverschiebung kann als eine posteriore homeotische Transformation bezeichnet werden. In Ergänzung dazu ist die dreizehnte thorakale Rippe in einigen der untersuchten E2f6^{-/-} Mäuse degeneriert. Dieses kann als eine Transformation des dreizehnten Thorakalwirbels zum ersten Lumbalwirbel interpretiert werden und bildet somit ebenfalls eine posteriore homeotische Transformation (Abbildung 4.10 (B)). In Tabelle 4.3 sind die beobachteten morphologischen Skelettveränderungen in den E2f6^{-/-} Mäusen zusammengefasst (siehe Seite 90). In keinem der Kontrolltiere wurde eine Transformation dieser Wirbelsegmente identifiziert. Die posteriore homeotische Transformation des sechsten Lumbalwirbels zum ersten Sakralwirbel konnte jedoch in 75% der untersuchten E2F6 defizienten Tiere beobachtet werden. Die Degeneration der dreizehnten thorakalen Rippe wurde in 25% der Tiere nachgewiesen. Dagegen war dieser Skelettphänotyp in E2f6 heterozygoten Tiere deutlich seltener zu erkennen. Möglicherweise deutet dieses auf einen Dosiseffekt von E2F6 hin, jedoch war die Anzahl der untersuchten E2f6^{+/-} Tiere gering.

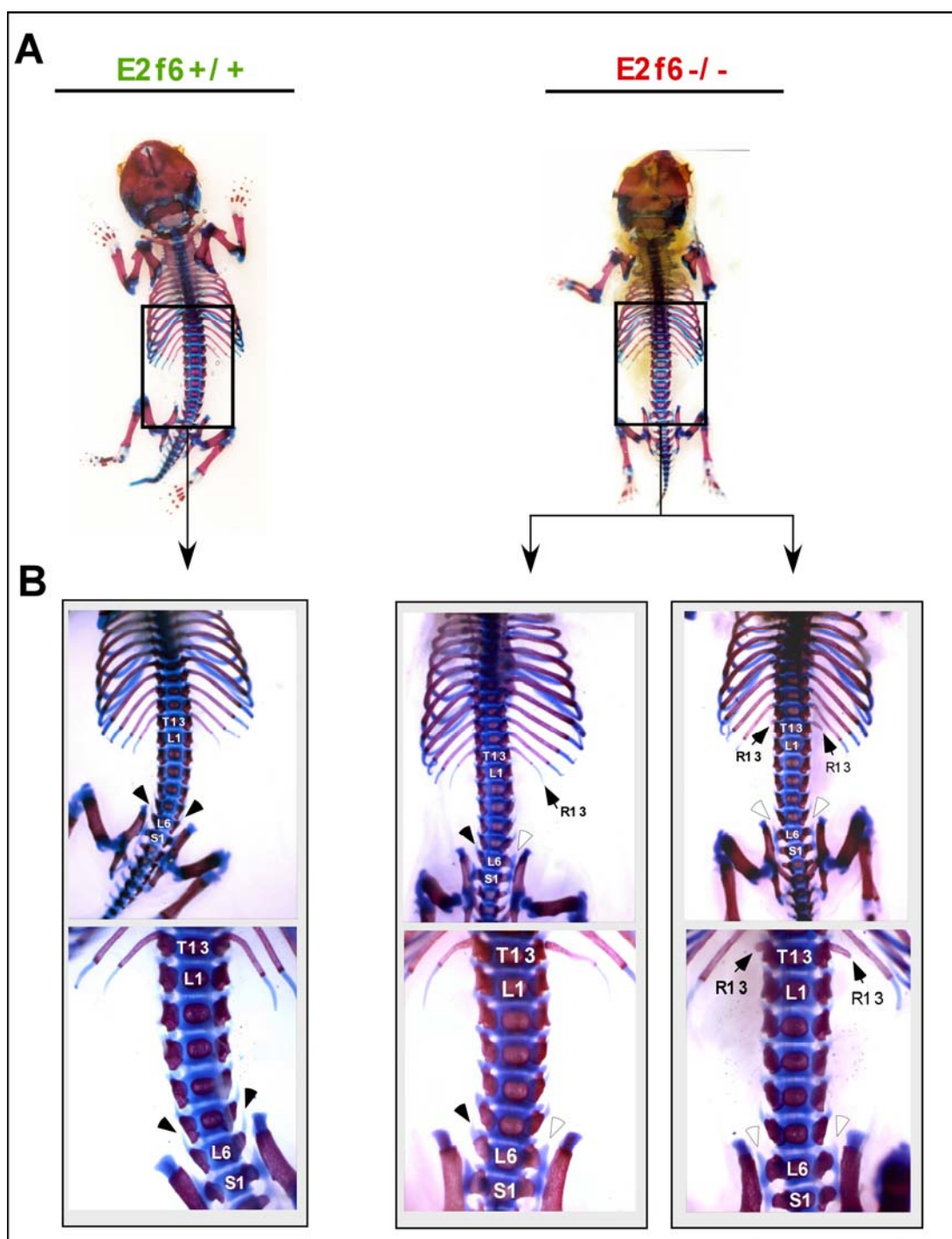


Abbildung 4.10: Posteriore homeotische Transformationen in $E2f6^{-/-}$ Mäusen

Ventrale Ansicht von Skeletten einer neugeborenen $E2f6^{-/-}$ und einer Kontrollmaus. Die Knochenanteile des Skelettes sind mit Alizarin-Rot, die Knorpelanteile mit Alcian-Blau gefärbt. Der markierte Abschnitt wurde vergrößert dargestellt. Der dreizehnte Thorakalwirbel (T13), der erste Lumbalwirbel (L1), der sechste Lumbalwirbel (L6) und der erste Sakralwirbel (S1) sind markiert. $E2f6^{-/-}$ Mäuse zeigen z.T. eine degenerierte dreizehnte Rippe (R13, weiße Pfeilspitze; normale Morphologie schwarze Pfeilspitze) und eine sakro-iliakische Verbindung sowohl an einer als auch an beiden Seiten von L6 (weiße Pfeilspitzen; normale Morphologie schwarze Pfeilspitzen). Diese Skelettveränderungen stellen sog. posteriore homeotische Transformationen dar.

Zusammengefasst zeigen E2f6^{-/-} Mäuse posteriore homeotische Transformationen, die eine auffällige Ähnlichkeit zu den in Polycomb defizienten Mäusen detektierten Skelettveränderungen aufweisen. Im Einklang mit den Skelettphänotypen Polycomb defizienter Mäuse waren auch in E2f6^{-/-} Mäusen die posterioren homeotischen Transformationen nicht zu 100% penetrant, d.h., dass nicht alle untersuchten Tiere diesen Phänotyp zeigen.

Phänotyp	Penetranz der Skeletttransformationen in %		
	E2f6 ^{+/+}	E2f6 ^{-/-}	E2f6 ^{+/-}
L6>S1	0	75	40
Einseitig	0	44	40
beidseitig	0	31	0
T13>L1	0	25	0
Einseitig	0	19	0
beidseitig	0	6	0

Tabelle 4.3: Penetranz posteriorer homeotischer Transformationen in E2f6^{-/-} Mäusen

In dieser Tabelle ist die Häufigkeit der in neugeborenen E2f6^{-/-} Mäusen und in 16.5 Tage alten E2f6^{-/-} Embryonen beobachteten posterioren homeotischen Transformationen entlang der antero-posterioren Achse zusammenfassend dargestellt.

Zwar sind die Segmentverschiebungen in E2F6 defizienten Mäusen im Gegensatz zu den transgenen Polycomb Mäusen auf den kaudalen Bereich der Wirbelsäule beschränkt, dennoch liefern diese Beobachtungen erstmals *in-vivo* Evidenz für eine funktionelle Interaktion von E2F6 mit Polycomb-Proteinen.

4.3.2 Die Expression homeotischer Gene in E2F6 defizienten Embryonen

Die Skeletttransformationen E2F6 defizienter Mäuse führen zu der Vermutung, dass, in Analogie zu den Beobachtungen in Polycomb defizienten Mäusen, die anterioren Expressionsgrenzen spezifischer Hox Gene delokalisiert sind.

In diesem Zusammenhang stellt sich zunächst die Frage, ob E2F6 während der Embryonalentwicklung exprimiert wird und in welchen Geweben diese Expression nachweisbar ist.

4.3.2.1 E2F6 ist in der Embryonalentwicklung ubiquitär exprimiert

Um die Expression von E2F6 während der Embryonalentwicklung zu untersuchen, wurden in-situ Hybridisierungen an 9.5 Tage alten Embryonen durchgeführt. Zu diesem Zeitpunkt ist die Expression homeotischer Gene initiiert und die anterioren Expressionsgrenzen durch Polycomb Proteinkomplexe determiniert (Burke *et al.*, 1995).

Hierzu wurden Wildtypmäuse verpaart, der Zeitpunkt der Befruchtung festgestellt und am Tag 9.5 der Schwangerschaft die Embryonen aus dem Uterus präpariert, entwässert und mit Paraformaldehyd fixiert (siehe 3.1.4). E2f6^{-/-} Embryonen aus einer Kreuzung E2F6 defizienter Tiere dienten als Kontrolle.

Für die in-situ Hybridisierung wurde eine mit Digoxigenin (DIG) markierte RNA Sonde generiert, die komplementär zur E2F6 mRNA ist. Diese Sonde wurde nach der Hybridisierung mit einem anti-DIG Antikörper spezifisch detektiert. Der Antikörper ist mit einer Alkalischen Phosphatase gekoppelt, das im Rahmen einer Farbstoffreaktion zur Anfärbung der E2F6 exprimierenden Gewebe genutzt wird (siehe 3.6.2).

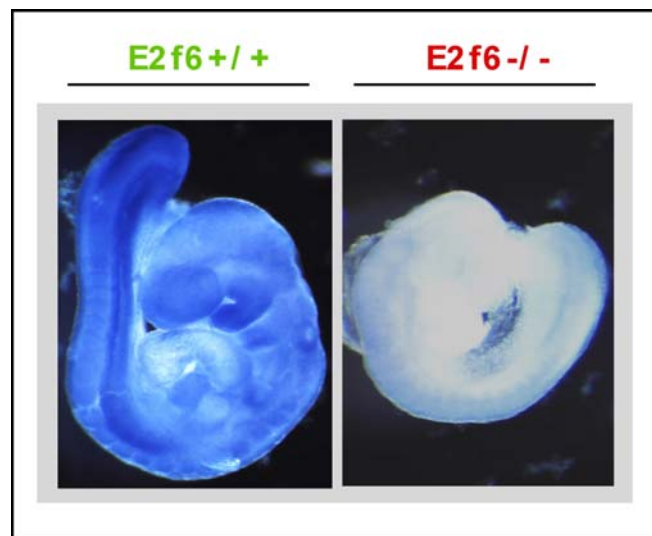


Abbildung 4.11: E2F6 wird ubiquitär am Tag 9.5 der Embryonalentwicklung exprimiert

Eine Digoxigenin (DIG) markierte, zur E2F6 mRNA komplementäre RNA Sonde, wurde mit 9.5 Tage alten E2f6^{+/+} und E2f6^{-/-} Embryonen hybridisiert. Die Detektion der Sonden erfolgte mit einem mit alkalischer Phosphatase gekoppelten anti-DIG Antikörper und einer anschließenden Färbereaktion. Die blaue Färbung markiert somit die Gewebe, in denen die E2F6 mRNA am Tag 9.5 der Embryonalentwicklung exprimiert wird.

Wie in Abbildung 4.11 zu erkennen ist, wird E2F6 am Tag 9.5 der Embryonalentwicklung exprimiert. Die gleichmäßige blaue Färbung des Embryos deutet auf eine ubiquitäre Ex-

pression von E2F6 zu diesem Zeitpunkt der Embryonalentwicklung hin. Es konnte keine verstärkte Expression in den mesodermalen Segmenten entlang der antero-posterioren Achse beobachtet werden. Die Kontrolle mit E2F6 defizienten Embryonen zeigt dagegen wie erwartet keine Färbung.

Dieses Ergebnis bestätigt vorangegangene Analysen durch Dr. Stefan Gaubatz, die eine ubiquitäre E2F6 Expression am Tag 13.5 der Embryonalentwicklung zeigten (Storre *et al.*, 2002).

4.3.2.2 Die Expression homeotischer Gene in E2f6^{-/-} Embryonen

Nachdem eine ubiquitäre Expression von E2F6 am Tag 9.5 und am Tag 13.5 der Embryonalentwicklung bestätigt werden konnte, sollte im Anschluss die Expression von Hox Genen untersucht werden.

Im Mausgenom existieren 39 verschiedene Hox Gene, die in 4 genomischen Klustern organisiert sind (Hox A-D). Nach dem Prinzip der Kolinearität werden die im 5' Bereich des Klusters lokalisierten Hox Gene in den kaudalen Segmentanlagen, die im 3' Bereich lokalisierten Hox Gene im kranialen Bereich exprimiert (Cilio *et al.*, 2001). Da sich die posterioren homeotischen Transformationen in E2f6^{-/-} Mäusen auf den kaudalen Bereich der embryonalen Längsachse beschränkten, wurden solche Hox Gene untersucht, die im 5' Bereich der Hox Genkluster lokalisiert sind.

Eine erste Untersuchung im Rahmen dieser Arbeit umfasste die Hox Gene Hox C9 und Hox D9, Hox B8 und Hox C8 sowie Hox C10 und Hox C11. Das bis in den kranialen Bereich der antero-posterioren Achse exprimierte Hox B3 Gen diente als Kontrolle. Für diese Hox Gene wurden jeweils DIG markierte RNA-Sonden generiert und diese für in-situ Hybridisierungen an 9.5 Tage alten Embryonen verwendet (siehe 3.6.2). Wie zuvor beschrieben, erfolgte die Detektion der RNA Sonden durch einen mit der alkalischen Phosphatase gekoppelten anti-DIG Antikörper und einer anschließenden Farbreaktion. Die in-situ Hybridisierungen für Hox C8 und Hox C10 sind in Abbildung 4.12 gezeigt. Die Hox C8 und Hox C10 exprimierenden Gewebe sind dunkel angefärbt. Eine deutliche anteriore Expressionsgrenze in den mesodermalen Anlagen konnte qualitativ gut dargestellt werden.

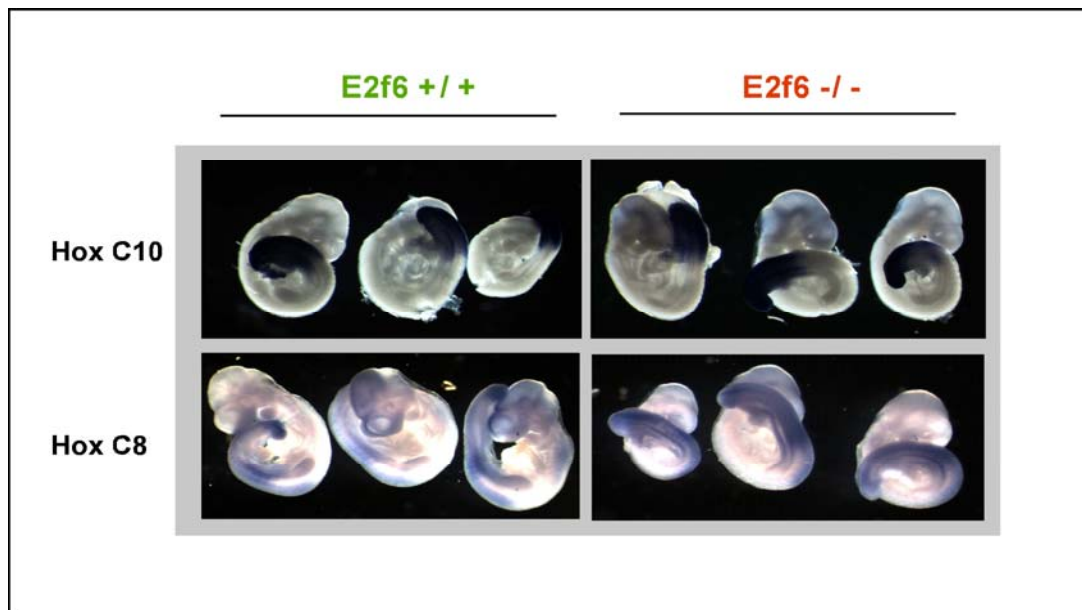


Abbildung 4.12: In-situ Hybridisierung von Hox C10 und Hox C8 an 9.5 Tage alten Embryonen

Eine Digoxigenin (DIG) markierte, zur Hox C8 bzw. Hox C10 mRNA komplementäre RNA- Sonde wurde synthetisiert und mit 9.5 Tage alten E2f6^{+/+} und E2f6^{-/-} Embryonen hybridisiert. Die Detektion der Sonden erfolgte mit einem mit der alkalischen Phosphatase gekoppelten anti-DIG Antikörper und einer anschließenden Färbereaktion. Die blau-dunkle Färbung markiert somit die Bereiche, in denen die Hox C8 bzw. die Hox C10 mRNA exprimiert wird. Auf diese Weise konnte eine anteriore Expressionsgrenze dieser Hox Gene dargestellt werden.

Zur Bestimmung der anterioren Expressionsgrenzen der untersuchten Hox Gene und zum Vergleich zwischen E2f6^{+/+} und E2f6^{-/-} Embryonen wurde jeweils die Anzahl der mesodermalen Somiten ermittelt, die nicht durch die in-situ Hybridisierung gefärbt wurden (siehe 3.6.2.2). Zwar ist diese Auswertung durch eine schwer identifizierbare Somitenanzahl im kranialen Bereich der antero-posterioren Achse erschwert, dennoch ist von einer Genauigkeit der Auszählung von +/-1 Segment auszugehen. In Tabelle 4.4 sind die Ergebnisse dieser Auszählung für die in-situ Hybridisierungen der genannten Hox Gene zusammengefasst: Die Hox B3 Expression umfasste wie erwartet die gesamte antero-posteriore Achse. Die Expression der untersuchten Hox Gene in E2f6^{-/-} und in Kontrollembryonen hatte eine vergleichbare Intensität, allerdings ist eine Quantifizierung mit dieser Methode schwierig. Die Anzahl der nicht-angefärbten Somiten in den E2f6^{-/-} Embryonen entsprach der Anzahl in den Kontrollembryonen. Somit konnte für die hier untersuchten Hox Gene keine Verschiebung der Expressionsgrenze in E2F6 defizienten Embryonen identifiziert werden (Tabelle 4.4).

Hox Gen	Anteriore Expressionsgrenze	
	E2f6+/+	E2f6-/-
Hox C9	17-19 Segmente (n=5)	17-19 Segmente (n=8)
Hox D9	18-19 Segmente (n=5)	18-19 Segmente (n=4)
Hox B8	10-11 Segmente (n=4)	10-11 Segmente (n=5)
Hox C8	16 -17 Segmente (n=3)	16 -17 Segmente (n=3)
Hox C10	22-23 Segmente (n=4)	22-23 Segmente (n=3)
Hox C11	26-28 Segmente (n=5)	26-28 Segmente (n=3)
Hox B3	3-4 Segmente (n=3)	3-4 Segmente (n=3)

Tabelle 4.4: Keine Delokalisation anteriorer Expressionsgrenzen spezifischer Hox Gene in E2f6-/- Embryonen

Die anterioren Expressionsgrenzen verschiedener Hox Gene wurden mit einer in-situ Hybridisierung in E2f6-/- bzw. in E2f6+/+ Embryonen dargestellt. Zum Vergleich der Lokalisation dieser Expressionsgrenze wurden die mesodermalen Segmente zwischen der Expressionsgrenze und dem ersten kranialen Segment (Segment 1) ausgezählt und die Anzahl zwischen E2f6-/- und Kontrollembryonen verglichen (Anzahl der ausgezählten Segmente und die Anzahl der untersuchten Embryonen ist jeweils angegeben).

Jedoch ist zu beachten, dass nur eine Auswahl an Hox Genen untersucht werden konnte. Diese Untersuchungen müssten ausgeweitet werden auf alle Hox Gene, die in den kaudalen Anteilen der antero-posterioren Achse exprimiert werden.

4.4 Identifizierung E2F6 regulierter Gene

Um E2F6 regulierte Gene zu identifizieren und mit bereits publizierten Zielgenen des humanen E2F6 zu vergleichen (siehe 1.4.2.4), wurde im Rahmen dieser Arbeit ein systematischer Ansatz angewendet.

4.4.1 Expressionsanalyse von E2f6^{-/-} Fibroblasten

Um E2F6 regulierte Gene zu identifizieren, sollte die Genexpression E2F6 defizienter Zellen untersucht und mit dem Expressionsmuster von Kontrollzellen verglichen werden. Hierzu wurden, wie zuvor beschrieben, primäre embryonale Fibroblasten isoliert (siehe 3.2.1). Für die Analyse der Genexpression wurden jeweils zwei E2f6^{-/-} Fibroblastenkclone (P-2) vermischt, um interne Varianzen im Genexpressionsmuster auszugleichen. Entsprechend wurde mit E2f6^{+/+} Zellen verfahren. Die Fibroblasten wurden expandiert (P-3) und durch Inkubation in Hungermedium in der G0 Phase des Zellzyklus arretiert (siehe 3.2.4). Nach 72h wurden die Zellen mit Vollmedium inkubiert, in den Zellzyklus synchron zurückgeführt und die Gesamt-RNA wachsender Zellen nach 20h isoliert. Wie in Abschnitt 4.2.3, gezeigt befindet sich zu diesem Zeitpunkt ein großer Anteil der Zellen in der Replikationsphase (S-Phase).

Durch eine reverse Transkription wurde die aus den Fibroblasten isolierte Gesamt-RNA (siehe 3.5.2.1) in eine cDNA umgeschrieben. Dabei wurde Aminoallyl markiertes dUTP (aaUTP) verwendet und die cDNA somit markiert. Zunächst wurden die cDNA Proben durch eine Veresterung der Aminoallyl Reste mit monoreaktiven, fluoreszierenden Cy3 und Cy5 Farbstoffen spezifisch markiert. Anschließend wurde in einem ersten Ansatz die E2f6^{-/-} cDNA mit Cy3, die E2f6^{+/+} cDNA mit Cy5 markiert, in einem zweiten Ansatz wurde umgekehrt verfahren („*Dye-Swap*“ Verfahren; siehe 3.6.3). Die markierten cDNA Proben aus E2f6^{-/-} Fibroblasten und Kontrollzellen wurden zusammengeführt und mit einem cDNA *Microarray* hybridisiert. Dieser umfasste 11.500 cDNA Proben (im Folgenden als *Spots* bezeichnet), von denen 9.000 Proben aus einer 15K Maus cDNA Bibliothek (15k mouse cDNA library, National Institute of Aging; USA) amplifiziert wurden und weitere 2500 aus einer 7K Maus cDNA Bibliothek (7K mouse cDNA library, National Institute of Aging; USA, siehe 3.6.3). Die Intensität der Fluoreszenz eines *Spots* auf dem *Microarray* nach der Hybridisierung mit der fluoreszenzmarkierten cDNA Probe korreliert mit dem Expressionsgrad des entsprechenden Gens im Ausgangsmaterial. Mit einem Scanner kann-

ten die unterschiedlichen Fluoreszenzintensitäten der cDNA *Spots* auf dem Array erfasst und statistisch ausgewertet werden. Das experimentelle Vorgehen ist in Abbildung 4.13 zusammenfassend dargestellt.

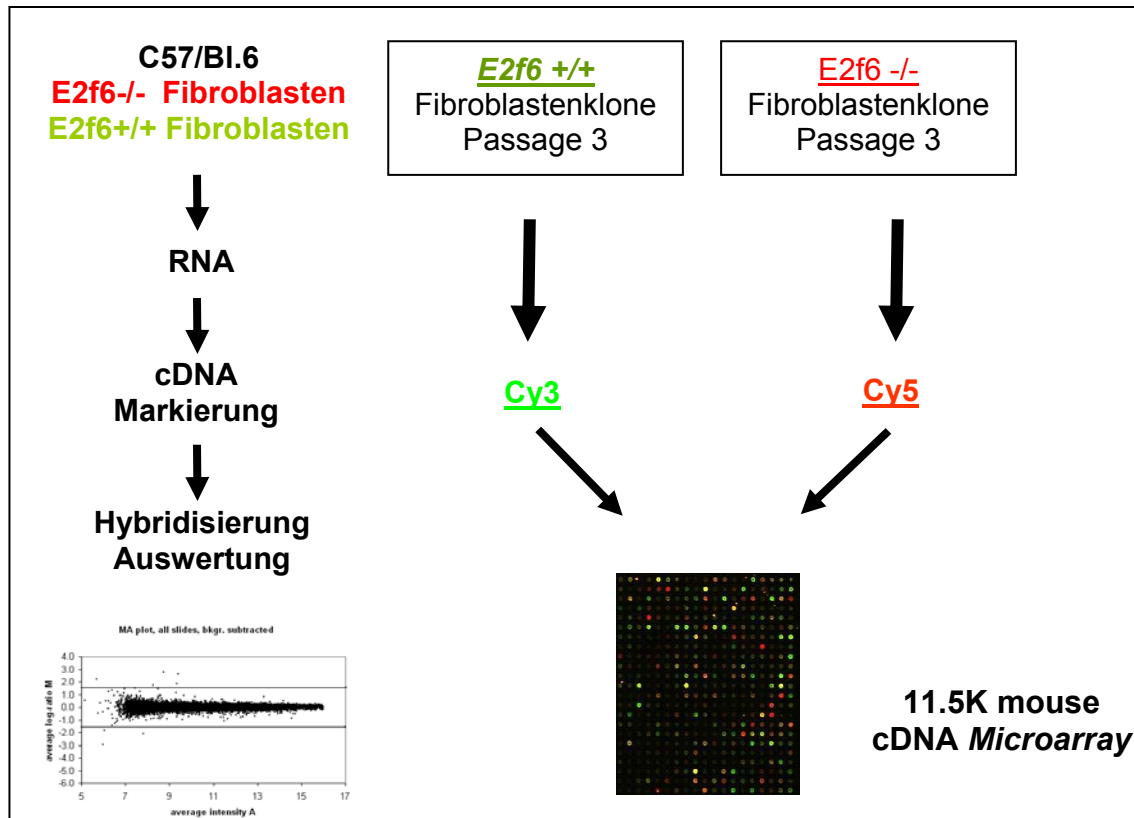


Abbildung 4.13: Versuchsaufbau zur vergleichenden Expressionsanalyse von E2f6^{-/-} und E2f6^{+/+} Fibroblasten mit einem cDNA Microarray

Gesamt-RNA aus wachsenden E2f6^{-/-} und E2f6^{+/+} Fibroblasten wurde isoliert, cDNA synthetisiert, diese mit fluoreszierenden Farbstoffen markiert und mit einem 11.5k Maus cDNA Microarray hybridisiert. Das Fluoreszenzmuster wurde erfasst, die Fluoreszenzintensitäten verglichen und statistisch ausgewertet.

Da E2F6 ein transkriptioneller Repressor ist, sind in Tabelle 4.5 die Gene zusammengefasst, die in E2f6^{-/-} Zellen im Vergleich zur Wildtyp Kontrolle stärker exprimiert sind. In dieser Tabelle ist die jeweilige verstärkte Expression eines spezifischen Gens in E2F6^{-/-} Fibroblasten angegeben (siehe 3.6.3). Unter den in E2f6^{-/-} Fibroblasten signifikant verstärkt exprimierten Genen befanden sich das Adipogenese regulierende Gen (Adfp; *NM_007408*) und das für die regulatorische Untereinheit 2B der Proteinkinase A kodierende Gen (Prkar2b; *XM_126885*). Für beide jedoch war die verstärkte Expression in einem

weiteren cDNA *Microarray* Analyse nicht reproduzierbar und konnte somit nicht bestätigt werden.

Jedoch war auffällig, dass zwei Gene, für die eine Funktion in der Meiose beschrieben wurde, in E2f6^{-/-} Fibroblasten verstärkt exprimiert waren. Das Smc112 Gen (*Structural Maintenance of Chromosomes 112*; NM_080470) und das Stag3 Gen (*Stromale Antigen 3*; NM_016964) gehören zur Gruppe der Kohäsine, die während der meiotischen Zellteilungen die Adhäsion von Schwesterchromatiden vermitteln. Die verstärkte Expression von Smc112 und Stag3 in E2F6 defizienten Fibroblasten konnte mit einer weiteren cDNA *Microarray* Expressionsanalyse bestätigt werden.

Eine verstärkte Expression in E2f6^{-/-} Fibroblasten zeigten ebenfalls drei unbekannte, noch nicht charakterisierte Gene. Dabei konnte bisher die Überexpression des Gens XM_196054 in einer weiteren Expressionsanalyse mit einem cDNA *Microarray* bestätigt werden.

Gen	x-fach verstärkt exprimiert (fold change)	Datenbank	Funktion
Unbekannt	6,8	XM_196054	Unbekannt
Smc112	6,0	NM_080470	Miose
Stag3	2,7	NM_016964	Miose
Unbekannt	1,9	AK050607	Unbekannt
Unbekannt	1,9	XM_137736	Unbekannt
Adfp	1,8	NM_007408	Adipogenese
Prkar2b	1,7	XM_126885	viele

Tabelle 4.5: Verschiedene Gene sind in E2f6^{-/-} Fibroblasten verstärkt exprimiert

In dieser Tabelle sind die Gene zusammengefasst, die in E2f6^{-/-} Fibroblasten im Vergleich zu Kontrollzellen verstärkt exprimiert sind. Die „x-fach verstärkte Expression“ (*Fold change*) ist angegeben. Diese ergibt sich aus dem Vergleich der Fluoreszenzintensitäten individueller cDNA *Spots* auf dem Maus cDNA *Microarray*. Die in dieser Tabelle hervorgehobenen Gene konnten in einer unabhängigen zweiten Expressionsanalyse bestätigt werden.

Somit ergab dieser systematische experimentelle Ansatz erste Hinweise auf E2F6 regulierte Gene. Vor dem Hintergrund, dass die Spermatogenese E2F6 defizienter Mäuse beeinträchtigt ist (siehe 4.1.2), war die Identifizierung der meiotischen Kohäsine Smc112 und

Stag3 interessant. Möglicherweise deuten diese Ergebnisse auf eine gewebespezifische Funktion von E2F6 hin.

Im Folgenden sollten die Ergebnisse der Expressionsanalyse durch experimentell alternative Ansätze bestätigt werden.

4.4.2 Bestätigung der verstärkten Expression von Stag3, Smc112 und XM_196054 in E2f6^{-/-} Fibroblasten

Um die Ergebnisse der systematischen Expressionsanalyse zu bestätigen, wurde Gesamt-RNA aus E2f6^{-/-} Fibroblasten und Kontrollzellen isoliert, mit einer reversen Transkription in eine cDNA umgeschrieben und anschließend die Expression der RNA mit einer semi-quantitativen Polymerase Kettenreaktion (PCR) analysiert (siehe 3.5.2.1 und 3.6.1).

Es konnte keine Expression von Smc112, Stag3 und XM_196054 in den Kontrollzellen detektiert werden (Abbildung 4.14 (A)). Dies steht im Einklang für die ausschließlich in meiotischen Zellen nachgewiesene Expression von Smc112 und Stag3 (Revenkova *et al.*, 2001; Pezzi, N. *et al.*, 2000). Im Gegensatz dazu zeigte die Expressionsanalyse mit einer RT-PCR eine signifikante, reproduzierbare Expression von Smc112 und Stag3 in E2f6^{-/-} Fibroblasten. Ebenfalls konnte für das Gen XM_196054 eine deutlich erhöhte Expression nachgewiesen werden (Abbildung 4.14 (A)). Untersuchungen von Andrea Rubeck hierzu ergaben, dass XM_196054 wie Stag3 und Smc112 ausschließlich in Hodengewebe exprimiert wird (nicht gezeigt). Möglicherweise ist XM_196054 somit ebenfalls ein Meiose spezifisches Gen. Die Expression von Aktin war in allen Proben gleichmäßig.

In Ergänzung dazu wurde die Expression von Stag3 in E2F6 defizienten Fibroblasten mit einem Western Blot nachgewiesen. Hierzu wurden Lysate aus E2f6^{-/-} Fibroblasten und aus Kontrollzellen präpariert (siehe 3.7.2), in einem SDS Proteingel aufgetrennt und mit einem Immunoblot analysiert (siehe 3.7.4–3.7.6). Die Expression von Stag3 in E2F6 defizienten Fibroblasten konnte mit einem spezifischen Antikörper (Verdünnung 1:200) nachgewiesen werden (Abbildung 4.14 (B)). Da kein Smc112 spezifischer Antikörper zur Verfügung stand, konnte die Smc112 Expression in E2f6^{-/-} Zellen noch nicht mit einer Proteinexpressionsanalyse bestätigt werden.

Zusammengefasst ergibt sich, dass die mit einem cDNA *Microarray* identifizierten in E2F6 defizienten Fibroblasten deregulierten Gene durch unabhängige experimentelle Untersuchungen als mögliche direkte E2F6 Zielgene bestätigt werden konnten.

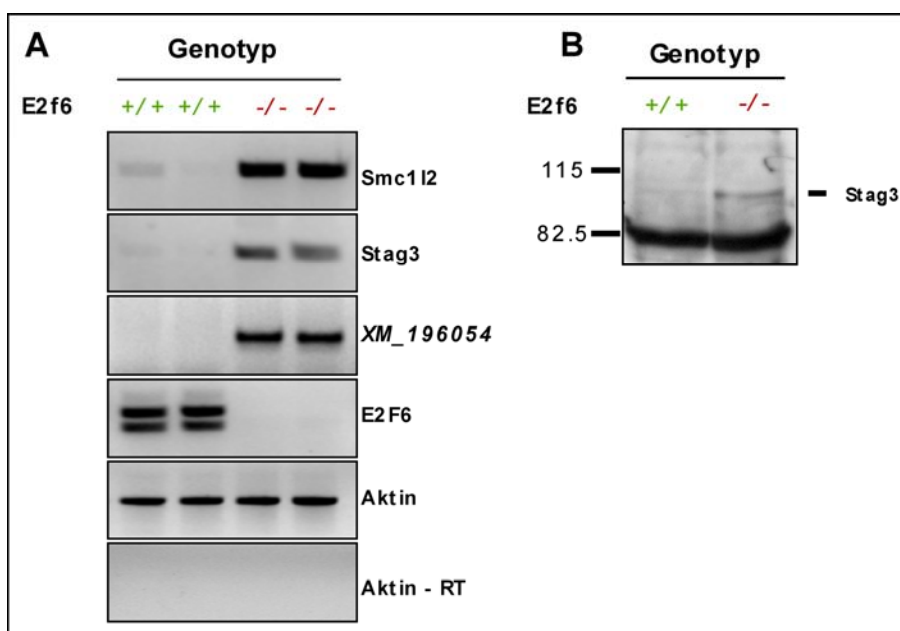


Abbildung 4.14: Smc112, Stag3 und XM_196054 sind in embryonalen E2f6-/- Fibroblasten verstärkt exprimiert

(A) Aus je zwei E2f6^{-/-} und E2f6^{+/+} Fibroblastenklonen wurde Gesamt-RNA isoliert, cDNA synthetisiert und mit einer PCR die Expression von Smc112, Stag3 und XM_196054 untersucht. Die Verifizierung des Genotyps der verwendeten Fibroblasten erfolgte mit einer E2F6 PCR. Wie die PCR für Aktin zeigt, wurde für alle Proben die gleiche Ausgangsmenge an Gesamt-RNA verwendet. Um die Proben auf DNA Kontaminationen zu überprüfen, diente eine Kontrollreaktion ohne Reverse Transkriptase (-RT). (B) Zellysate von E2f6^{-/-} und Kontrollfibroblasten wurden hergestellt und die Stag3 Expression mit einem anti-Stag3 Antikörper (Verdünnung 1:200) untersucht.

4.4.3 E2F6 reprimiert die Expression meiotischer Gene in somatischen Zellen

In somatischen E2F6 defizienten embryonalen Fibroblasten ist die Expression der meiotischen Gene Smc112 und Stag3 signifikant erhöht. Um zu untersuchen, ob sich diese Expression auf E2f6^{-/-} Fibroblasten während der Embryonalentwicklung beschränkt oder auch in adultem ausdifferenziertem Gewebe detektiert werden kann, sollte die Expression von Smc112 und Stag3 postnatal in somatischen Zellen von E2f6^{-/-} Mäusen analysiert werden.

Dazu wurde die RNA aus Leber- und Hodengewebe von männlichen E2F6 defizienten Mäusen und einer Kontrollmaus isoliert (siehe 3.5.2.3). Nach Synthese der cDNA wurde die Stag3 und Smc112 Expression mit einer PCR untersucht. Die Expression von Stag3 in adultem Lebergewebe ist im Vergleich zur E2f6^{+/+} Kontrolle signifikant erhöht. Eine verstärkte Expression konnte auch für Smc112 gezeigt werden. Wie erwartet werden Smc112

und Stag3 in Hodengewebe unabhängig vom Genotyp gleichmäßig exprimiert. In allen Proben war eine gleichmäßige Aktinexpression festzustellen (Abbildung 4.15).

Somit konnte bestätigt werden, dass die Meiose spezifischen Gene Smc112 und Stag3 auch in somatischem adultem Gewebe von E2F6 defizienten Mäusen exprimiert werden.

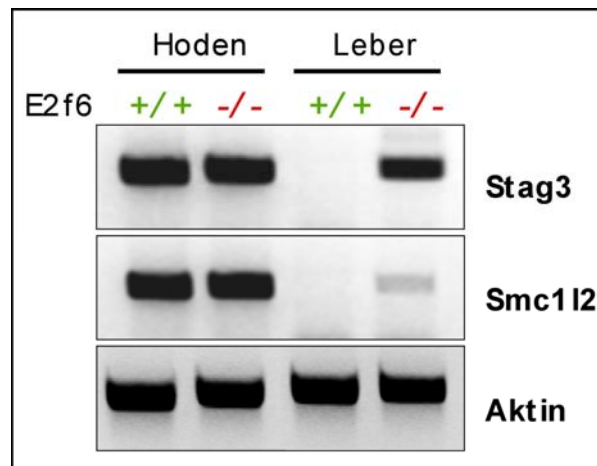


Abbildung 4.15: Smc112 und Stag3 sind in somatischen E2f6^{-/-} Zellen exprimiert
Gewebeproben aus Hoden und Leber einer adulten Maus wurden entnommen, die Gesamt-RNA isoliert, cDNA synthetisiert und mit einer PCR die Expression von Smc112 und Stag3 analysiert. Die PCR für Aktin diente als Kontrolle.

4.4.4 BRCA1 ist in E2f6^{-/-} embryonalen Fibroblasten normal exprimiert

Oberley *et al.* identifizierten mit einem systematischen *ChIP on CHIP* Ansatz E2F6 regulierte Gene in humanen Tumorzellen (Oberley *et al.*; 2003). Dabei handelt es sich um eine Kombination aus Chromatinimmunpräzipitationen und einer nachfolgenden Analyse der DNA Fragmente unter Verwendung eines promotorspezifischen *Microarrays* (Weinmann *et al.*, 2002; siehe 1.3.3). In diesem Zusammenhang wurden u.a. BRCA1 (*Breast Cancer associated gene-1*), die BRCA1 regulatorischen Proteine CtIP (*CtBP-Interacting Protein*) und CHEK2 (*Cell-Cycle Checkpoint Kinase 2*) sowie die Gene für HP1 (*Heterochromatin Protein 1*), RbAp 48 (*Rb-Associated protein 48*) und art27 (*Androgene receptor trapped clone 27*) als Zielgene des humanen E2F6 ermittelt. Da nicht alle der von Oberley *et al.* publizierten E2F6 Zielgene auf dem im Rahmen dieser Arbeit verwendeten cDNA *Microarray* vertreten waren, sollte durch eine semiquantitative Expressionsanalyse mit einer RT-PCR die Expression von BRCA1, HP1, RbBp48 und art27 in E2f6^{-/-} Fibroblasten überprüft und mit Kontrollzellen verglichen werden (siehe 3.6.1).

Wie Abbildung 4.16 zeigt, wurde weder für BRCA1, HP1 noch für RbAp48 oder art27 eine signifikante Überexpression in E2F6 defizienten Fibroblasten gezeigt. Somit ist zu vermuten, dass diese von Oberley *et al.* identifizierten Zielgene des humanen E2F6 keine Zielgene des murinen E2F6 darstellen.

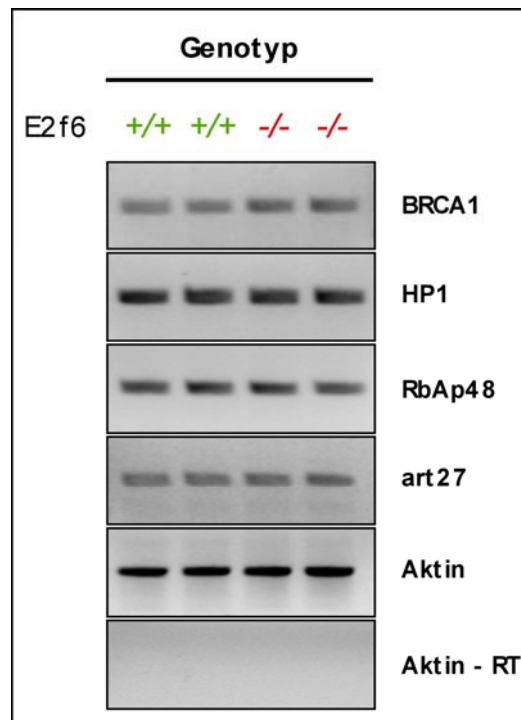


Abbildung 4.16: BRCA-1 ist in embryonalen E2f6^{-/-} Fibroblasten nicht verstärkt exprimiert

(A) Aus je zwei E2f6^{-/-} und E2f6^{+/+} Fibroblastenklonen wurde die Gesamt-RNA isoliert, cDNA synthetisiert und mit einer PCR die Expression von BRCA-1, HP1 α , RbAp48 und art27 untersucht. Wie die PCR für Aktin zeigt, wurde für alle Proben die gleiche Ausgangsmenge an Gesamt RNA verwendet.

4.4.5 Re-Expression von E2F6 in E2f6^{-/-} Fibroblasten reprimiert die Expression von Stag3, Smc112 und XM₁₉₆₀₅₄

Es sollte nun untersucht werden, ob die deregulierte Expression von Smc112, Stag3 und XM₁₉₆₀₅₄ in E2f6^{-/-} Fibroblasten durch eine Re-Expression von E2F6 inhibiert werden kann. Dies wäre ein erster Hinweis auf eine direkte Regulation dieser Gene durch E2F6.

Hierzu wurden E2f6^{-/-} embryonale Fibroblasten (P-3) mit replikationsdefizienten Retroviren infiziert. Diese tragen neben dem murinen E2F6 Gen ein Puromycin Resistenzgen, so

dass eine Selektion der infizierten Fibroblasten möglich war. Die Selektionsdauer betrug ca. 48h und wurde mit nicht-infizierten Fibroblasten kontrolliert (siehe 3.3.3).

Aus den infizierten Fibroblasten wurde die Gesamt-RNA isoliert (siehe 3.5.2.1), in eine cDNA umgeschrieben und die Expression von *Smc112*, *Stag3* und *XM_196054* mit einer semiquantitativen PCR untersucht (siehe 3.6.1).

Nach der retroviralen Infektion wurde E2F6 in *E2f6*^{-/-} Fibroblasten exprimiert (siehe Abbildung 4.17 (A)). Diese Re-Expression von E2F6 inhibiert gleichzeitig die Expression von *Smc112*, *Stag3* und von *XM_196054* im Vergleich zu den mit Kontrollvirus infizierten Fibroblasten. Im Gegensatz dazu ist die Expression von Aktin in allen Proben gleichmäßig. Dieses Ergebnis liefert einen weiteren Hinweis, dass es sich bei *Smc112*, *Stag3* und *XM_196054* um E2F6 regulierte Gene handelt.

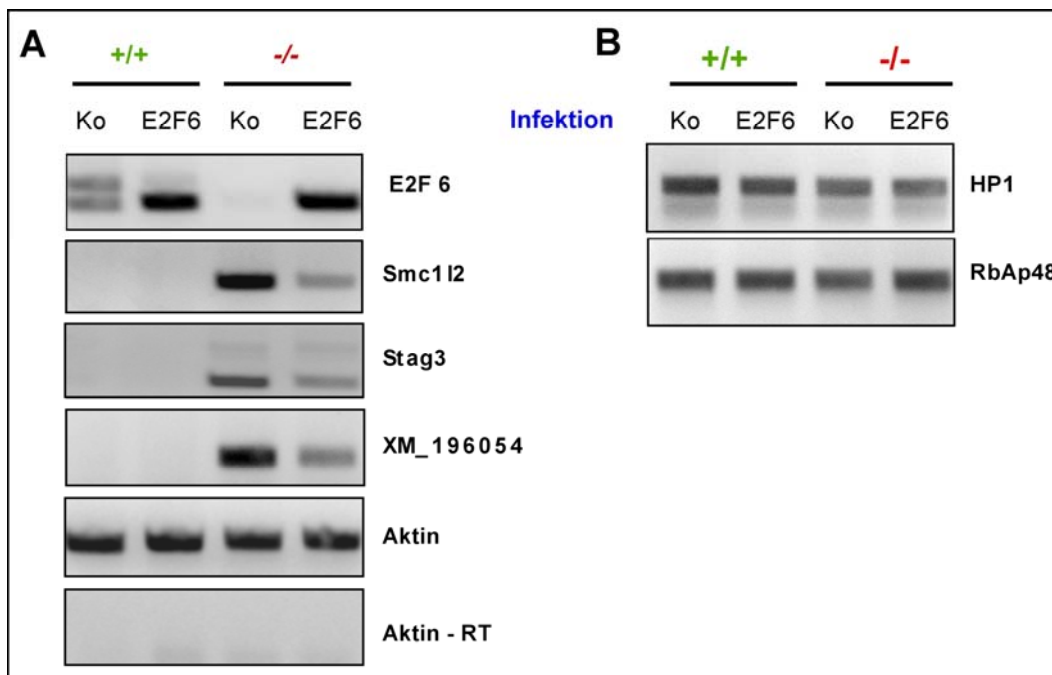


Abbildung 4.17: Die E2F6 Re-Expression in embryonalen *E2f6*^{-/-} Fibroblasten inhibiert die Expression von *Smc112*, *Stag3* und *XM_196054*

E2F6 wurde durch eine retrovirale Infektion in *E2f6*^{-/-} Fibroblasten re-exprimiert und anschließend die Gesamt-RNA isoliert, cDNA synthetisiert und die Expression von *Smc112*, *Stag3*, *XM_196054* (A) und von HP1 α und RbAp48 (B) analysiert. Die Infektion wurde mit einer E2F6 PCR überprüft. Wie die PCR für Aktin zeigt, wurde für alle Proben die gleiche Ausgangsmenge an Gesamt RNA verwendet. Um die Proben auf DNA Kontaminationen zu überprüfen, wurde eine Kontrollreaktion ohne reverse Transkriptase durchgeführt (-RT).

Im dem gleichem Ansatz wurde die Expression von HP1 α und RbAp48 untersucht. Im Einklang mit der zuvor erwähnten semiquantitativen Expressionsanalyse dieser Gene in *E2f6*^{-/-}

/- Fibroblasten zeigte sich kein Effekt nach Re-Expression von E2F6 in E2F6 defizienten Fibroblasten. Dies bestätigt die zuvor erwähnte Vermutung, dass HP1 α und RbAp48 keine Zielgene des murinen E2F6 darstellen (Abb. 4.17 (B)). Für BRCA-1 konnte ebenfalls keine veränderte Expression in Antwort auf eine E2F6 Re-Expression in E2f6^{-/-} Fibroblasten beobachtet werden (nicht gezeigt).

Mit diesem hier verwendeten experimentellen Ansatz ist jedoch ein indirekter Effekt von E2F6 auf die Expression von Smc112, Stag3 und *XM_196054* weiterhin nicht auszuschließen. Daher sollte mit anderen Ansätzen eine direkte Regulation von Sm112, Stag3 und *XM_196054* durch E2F6 gezeigt werden.

4.5 Untersuchung zur E2F6 vermittelten Repression von Stag3 und Smc112

Um zu untersuchen, ob E2F6 Smc112 und Stag3 direkt reguliert, sollte überprüft werden, ob E2F6 an die Promotoren dieser Gene bindet. In einem weiteren Ansatz sollte analysiert werden, ob ein E2F6 spezifisches Bindeelement in diesen Promotoren identifiziert werden kann. Dieser Ansatz wurde zusammen mit Andrea Rubeck im Rahmen ihrer Diplomarbeit durchgeführt.

4.5.1 Identifizierung eines E2F6 spezifischen Bindeelements im Smc112 Promotor

Eine genaue Untersuchung der Sequenzen des Smc112 und des Stag3 Promotors führte zur Identifizierung zweier konservierter E2F Konsensussequenzen, die mit E2F-A und E2F-B bezeichnet wurden. E2FB bildet eine klassische E2F Konsensussequenz (siehe 1.2) und ist im Smc112 Promotor relativ zum Transkriptionsstart an Position -58, im Stag3 Promotor an Position -48 lokalisiert. E2FA unterscheidet sich von E2F-B in einem Nukleotid und ist im Smc112 Promotor an Position -70, im Stag3 Promotor an Position -109 lokalisiert (siehe Abbildung 4.18).

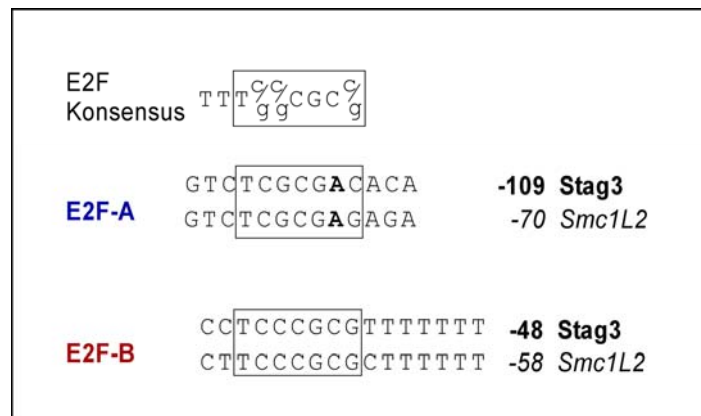


Abbildung 4.18: Der Smc112 und Stag3 Promotor enthält zwei E2F Bindemotive

Dargestellt sind zwei E2F Bindeelemente aus dem Smc112 und dem Stag3 Promotor und ihre Lokalisation relativ zum Transkriptionsstart. E2F-B ist eine klassische E2F Konsensussequenz, während sich E2F-A von dieser in einem Nukleotid unterscheidet (markiert).

Um die Funktion von E2F-A und E2F-B für die Regulation des Smc112 Promotors zu testen, wurde ein Fragment des Smc112 Promotors in den pGL2 Reporter Vektor kloniert. Das Fragment entsprach dem Promotorabschnitt 150 Nukleotide aufwärts und 50 Nukleotide abwärts vom Transkriptionsstart (-150/+50) und umfasste somit E2F-A und E2F-B (siehe Abbildung 4.19 (A)). Dieses Fragment wurde in E2f6^{-/-} bzw. in Kontrollzellen transfiziert und die Aktivität des Promotors bestimmt (siehe 3.3.1 und 3.7.1).

Im Einklang mit der Repression der Smc112 Expression konnte eine nur niedrige basale Aktivität des Promotorfragmentes in E2f6^{+/+} Fibroblasten gemessen werden. Im Gegensatz dazu war die Aktivität des Promotors in E2f6^{-/-} Fibroblasten deutlich erhöht (siehe Abbildung 4.19 (B)). Die Promotoraktivität konnte jedoch nach einer Re-Expression von E2F6 in E2F6 defizienten Fibroblasten signifikant inhibiert werden (siehe Abbildung 4.19 (C)). Diese Ergebnisse bestätigen eine E2F6 abhängige Regulation des Smc112 Promotors.

Um als nächstes die Funktion von E2F-A und E2F-B in der E2F6 vermittelten Repression genauer zu charakterisieren, wurden diese Sequenzelemente mutiert (Mut-A bzw. Mut-B; siehe Abbildung 4.19 (A)) und die Aktivität dieser Promotorfragmente in E2f6^{+/+} und E2f6^{-/-} Zellen bestimmt.

Die Mutation von E2F-A resultierte in einer niedrigeren Grundaktivität des Promotors, jedoch war die Aktivität in E2f6^{-/-} Fibroblasten weiterhin erhöht (siehe Abbildung 4.19 (B)) und durch eine Re-Expression von E2F6 inhibierbar (siehe Abbildung 4.19 (C)). Daher ist zu vermuten, dass E2F-A eine vorwiegend aktivierende Funktion in der Regulation des Smc112 Promotors hat.

Im Gegensatz dazu resultierte die Mutation von E2F-B in einem Verlust der Promotor Repression. Die Aktivität war nun in E2f6^{+/+} Fibroblasten deutlich erhöht und identisch mit der in E2f6^{-/-} Zellen gemessenen Aktivität (siehe Abbildung 4.19 (B)). In Ergänzung dazu konnte die Aktivität in E2f6^{-/-} Zellen durch Re-Expression von E2F6 nicht mehr inhibiert werden (Abbildung 4.19 (C)). Dies zeigt, dass E2F-B die inhibitorische Regulation des Smc112 Promotors vermittelt und möglicherweise ein E2F6 Bindeelement darstellt. Außerdem fiel auf, dass die Aktivität des E2F-B mutierten Promotors selbst in E2f6^{-/-} Fibroblasten deutlich höher war als die des Wildtyppromotors. Dies deutet daraufhin, dass E2F6 nicht der alleinige transkriptionelle Repressor ist, der über E2F-B eine Smc112 Inhibition vermittelt.

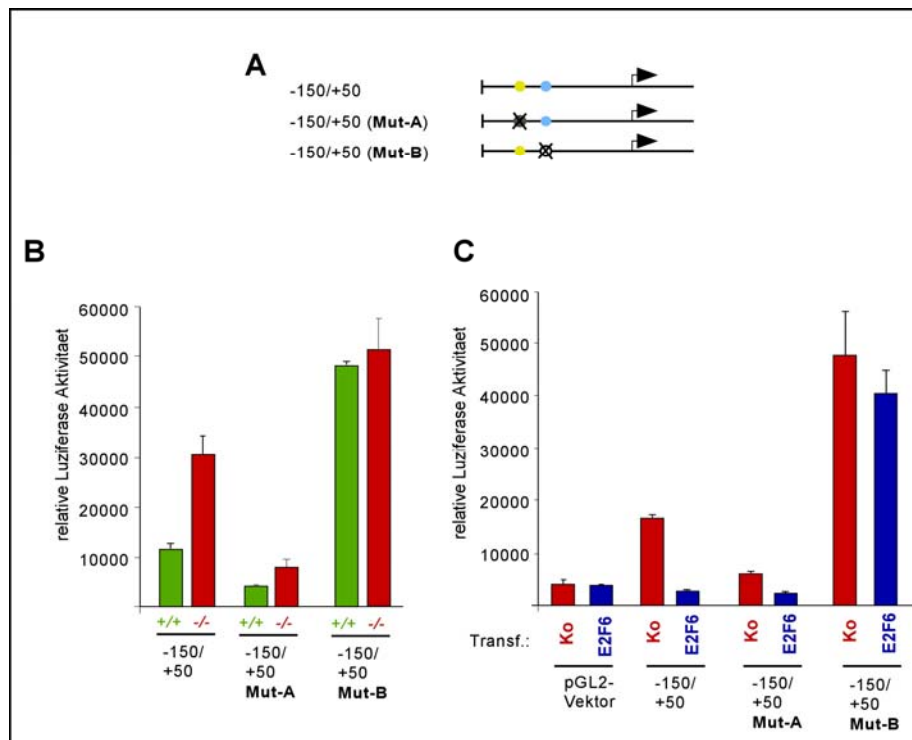


Abbildung 4.19: E2F6 inhibiert den Smc112 Promotor über das E2F-B Konsenselement

(A) Schematische Darstellung der in transienten Reporteranalysen verwendeten Promotorkonstrukte. (B) Reporteranalyse der in (A) angegebenen Fragmente in E2f6^{-/-} bzw. in Kontrollfibroblasten. (C) Reporteranalyse der in (A) angegebenen Konstrukte in E2F6 re-exprimierenden E2f6^{-/-} Fibroblasten.

4.5.2 E2F6 bindet an den endogenen Stag3 Promotor

Nachdem ein E2F6 spezifisches Element im Smc112 Promotor identifiziert werden konnte, sollte untersucht werden, ob E2F6 *in-vivo* direkt an den endogenen Stag3 und den Smc112 Promotor bindet. Für diesen Nachweis wurden Chromatinimmunpräzipitationen (ChIPs) verwendet. Hierzu wurden Zellen mit Formaldehyd behandelt und dadurch zelluläre DNA mit DNA-interagierenden Proteinen chemisch vernetzt. Aus den fixierten Zellen wurde Chromatin angereichert und die DNA durch Sonifizierungen fragmentiert. Mit proteinspezifischen Antikörpern werden schließlich Protein-DNA Fragmente immunpräzipitiert und die DNA mit spezifischen Oligonukleotiden durch eine PCR nachgewiesen. Somit kann die spezifische Bindung von Proteinen an einen endogenen Promotor gezeigt werden (siehe 3.7.8).

Zur Untersuchung einer E2F6 Bindung an den Stag3 Promotor wurde zunächst E2F6 in E2f6^{-/-} Fibroblasten wie zuvor beschrieben re-exprimiert (siehe 3.3.3). Im Anschluss daran konnte unter der Verwendung eines E2F6 spezifischen Antikörpers (siehe 3.7.9) mit ChIPs eine Bindung von E2F6 an den Stag3 Promotor gezeigt werden (Abbildung 4.20). Im Gegensatz dazu war die Bindung von E2F6 vier Kilobasen (Kb) abwärts im Stag3 Gen nicht nachweisbar. Somit konnte zunächst festgestellt werden, dass E2F6 nach Re-Expression in E2F6 defizienten Fibroblasten an den Stag3 Promotor bindet. Diese Beobachtung steht im Einklang mit einer Repression der Stag3 Expression durch E2F6.

Um die Bindung von endogenem E2F6 an den Stag3 Promotor zu untersuchen, wurden ChIPs und anschließende PCR Analysen aus E2f6^{+/+} im Vergleich zu E2f6^{-/-} Fibroblasten durchgeführt. Dabei konnte eine Bindung von endogenem E2F6 an den Stag3 Promotor nachgewiesen werden, nicht jedoch an einen Bereich vier Kb abwärts im Stag3 Gen (Abbildung 4.20). Das in E2f6^{-/-} Zellen deregulierte meiotische Gen Stag3 ist somit ein direktes Zielgen von E2F6 *in-vivo*. Zwar konnte noch kein E2F6 an dem Smc1L2 Promotor gezeigt werden, jedoch deuten erste Ergebnisse auf eine E2F6 Bindung auch an diesem Promotor hin (nicht gezeigt).

Damit konnten erstmals in primären murinen Fibroblasten E2F6 spezifische Zielgene identifiziert werden. Diese lieferten nun die Möglichkeit, einen E2F6 abhängigen Repressionsmechanismus zu untersuchen.

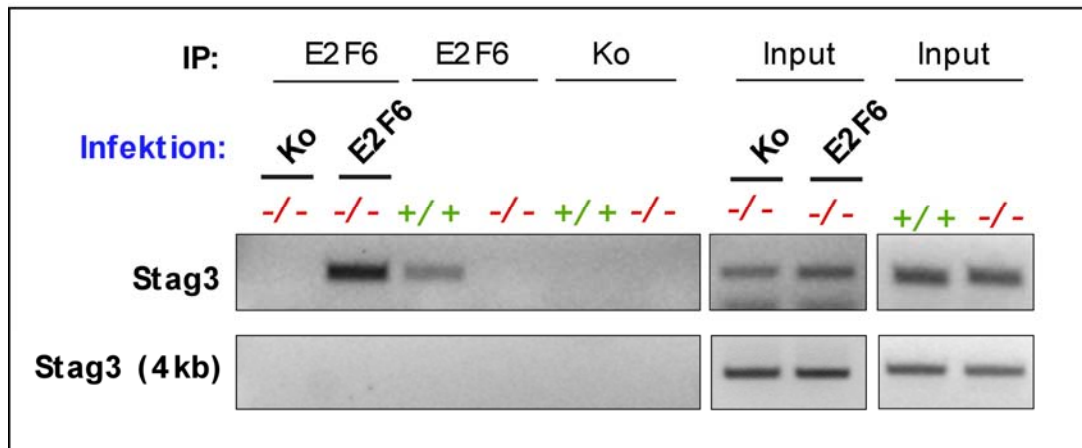


Abbildung 4.20: E2F6 bindet direkt an den Stag3 Promotor

Chromatin aus embryonalen E2f6^{-/-} Fibroblasten bzw. aus E2F6 re-exprimierenden E2f6^{-/-} Fibroblasten und aus entsprechenden Kontrollzellen wurde präpariert. ChIPs wurden mit einem E2F6 spezifischen Antikörper durchgeführt. Mit einer PCR wurde ein Abschnitt aus dem Stag3 Promotor bzw. aus einem Kontrollabschnitt vier Kb abwärts im Stag3 Gen amplifiziert. Die ChIPs wurden mit einem Ansatz ohne Antikörper kontrolliert (Kontrolle; Ko). Der Input entspricht 1% der für die ChIPs eingesetzten Chromatinmenge und diente als Kontrolle.

4.5.3 Der Stag3 Promotor ist in Abhängigkeit von E2F6 methyliert

Die Methylierungen von Lysin 9 und Lysin 27 im N-Terminus des Histon H3 (H3K9/H3K27) korrelieren mit einer transkriptionellen Inhibition des Promotors (Lachner und Jenuwein, 2003). Um zu untersuchen, ob Histonmethylierungen an der E2F6 vermittelte Repression beteiligt sind, sollte analysiert werden, ob der Stag3 und Smc112 Promotor an H3K9 oder H3K27 in Abhängigkeit von E2F6 methyliert ist. Hierzu wurden ChIPs mit Antikörpern durchgeführt, die eine Di- oder Trimethylierung im H3K9 erkennen (siehe 3.7.8 und 2.5.2). Die verwendeten Antikörper können jedoch mit einer Di- oder Trimethylierung am H3K27 kreuzreagieren. Die Untersuchung der Immunpräzipitate durch eine PCR mit Oligonukleotiden spezifisch für den Stag3 und Smc112 Promotor zeigte eine signifikante Methylierung von Lysin 9/27 des Histons H3 in E2f6^{+/+} Fibroblasten. Diese Methylierungen waren jedoch in E2F6 defizienten Zellen deutlich reduziert. Dabei konnte sowohl eine Dimethylierung als auch eine Trimethylierung des Lysin 9/27 im Histon H3 Protein identifiziert werden (Abbildung 4.21). Dieses Ergebnis zeigt, dass E2F6 für die Methylierung von Lysin 9 und/ oder Lysin 27 benötigt wird. Damit ist zu vermuten, dass E2F6 eine Histonmethyltransferase an den Smc112 und Stag3 Promotor rekrutiert.

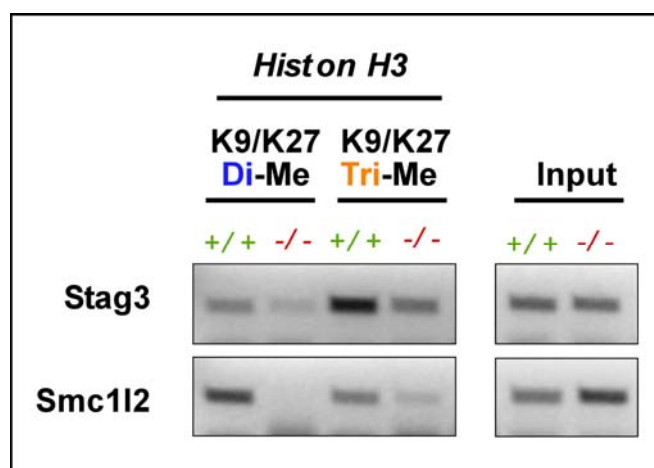


Abbildung 4.21: Der Smc112 und Stag3 Promotor ist am H3K9/H3K27 di- und trimethyliert

Chromatin aus embryonalen E2f6^{-/-} und Kontrollfibroblasten wurde präpariert. ChIPs wurden mit spezifischen Antikörpern zur Detektion von di- bzw. trimethyliertem H3K9/H3K27 durchgeführt. Mit einer PCR wurde ein Abschnitt aus dem Stag3 bzw. aus dem Smc112 Promotor amplifiziert. Die ChIPs wurden mit einem Ansatz ohne Antikörper kontrolliert (Kontrolle; Ko). Der Input entspricht 1% der für die ChIPs eingesetzten Chromatinmenge und diente als Kontrolle.

Durch die Kreuzreaktivität der Antikörper konnte jedoch nicht zwischen einer Methylierung von Lysin 9 oder Lysin 27 unterschieden werden. Daher wurden in einem weiteren Ansatz Antikörper verwendet, die jeweils eine Mono-, Di- und Trimethylierung von Lysin 9 bzw. Lysin 27 im Histon H3 spezifisch erkennen (Peters *et al.*, 2003). Unter Verwendung dieser spezifischen Antikörper konnte mit ChIPs gezeigt werden, dass H3K9 in E2f6^{+/+} Fibroblasten weder mono- noch trimethyliert ist. Jedoch konnte reproduzierbar eine Dimethylierung von H3K9 beobachtet werden (Abbildung 4.22).

In Ergänzung dazu konnte mit den spezifischen Antikörpern eine deutliche Trimethylierung von H3K27 am Stag3 Promotor in E2f6^{+/+} Fibroblasten gezeigt werden. Außerdem wurde eine Monomethylierung unabhängig vom Genotyp der Fibroblasten detektiert (Abbildung 4.22). Der Stag3 Promotor ist somit in Abhängigkeit von E2F6 an H3K9 dimethyliert und an H3K27 trimethyliert. Diese Ergebnisse lieferten erste Evidenz dafür, dass die Repression von Smc112 und Stag3 durch E2F6 über die Aktivität von Histonmethyltransferasen vermittelt wird. Vor dem Hintergrund der Assoziation von E2F6 mit den Histonmethyltransferasen G9a und EuHMTase in humanen Zellen ist eine sequenzspezifische Rekrutierung dieser Chromatin-modifizierenden Enzyme an E2F6 regulierten Promotoren denkbar.

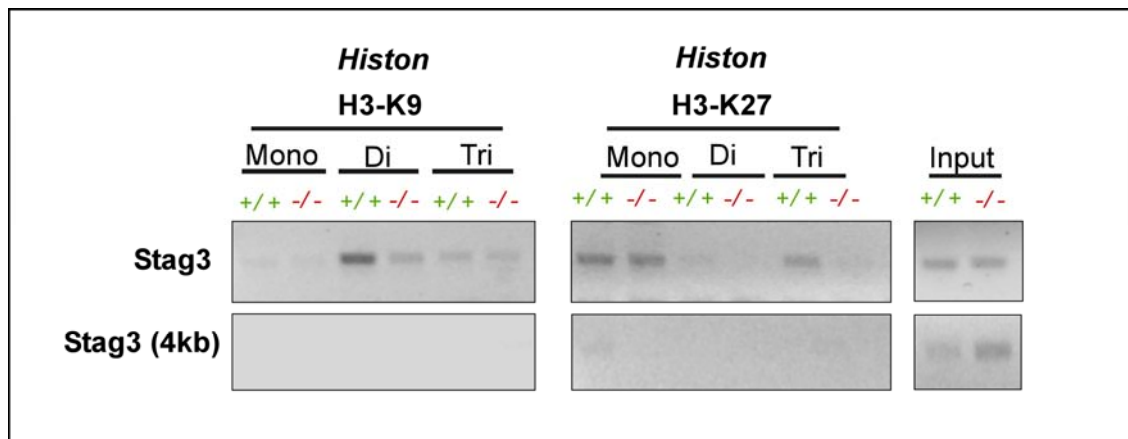


Abbildung 4.22: Der Stag3 Promotor ist an H3K9 dimethyliert und an H3K27 trimethyliert

Chromatin aus embryonalen *E2f6*^{-/-} und Kontrollfibroblasten wurde präpariert. ChIPs wurden mit spezifischen Antikörpern zur Detektion von mono-, di- bzw. trimethyliertem H3K9 und H3K27 durchgeführt. Mit einer PCR wurde ein Abschnitt aus dem Stag3 bzw. aus einem Kontrollabschnitt vier Kb abwärts im Stag3 Gen amplifiziert. Die ChIPs wurden mit einem Ansatz ohne Antikörper kontrolliert (Kontrolle; nicht gezeigt). Der Input entspricht 1% der für die ChIPs eingesetzten Chromatinmenge und diente als Kontrolle.

4.5.4 Funktion der Histonmethylierungen in der E2F6 vermittelten Repression

Durch die Methylierung von H3K9 und von H3K27 entstehen mögliche Bindungsstellen für weitere Chromatin assoziierte Proteine. So bindet das Heterochromatin Protein 1 (HP1) durch seine Chromodomäne an dimethyliertes H3K9. Eine Isoform des humanen HP1 Proteins, HP1 γ , wurde in einem humanen E2F6 Multiproteinkomplex nachgewiesen (siehe 1.4.2). Die Methylierung von H3K27 dient möglicherweise als Erkennungssignal für Polycomb Proteine (siehe 1.4.2.1).

Um zu untersuchen, ob HP1 γ an den Stag3 Promotor bindet, wurden ChIPs mit HP1 γ spezifischen Antikörpern etabliert und die Immunpräzipitate mit einer PCR untersucht. Eine Positivkontrolle erfolgte mit einer PCR für den *Col11a2* Promotor, für den eine Bindung von HP1 γ nachgewiesen werden konnte (Ayyanathan *et al.*, 2003). Wie in Abbildung 4.23 gezeigt, konnte die Bindung von HP1 γ auf dem *Col11a2* Promotor nachgewiesen werden, nicht jedoch auf dem Stag3 Promotor. Somit scheint die E2F6 abhängige Dimethylierung von H3K9 nicht zu einer Bindung von HP1 γ an den Stag3 Promotor zu führen. In einem weiteren Experiment konnte ebenfalls kein HP1 α auf dem Stag3 Promotor nachgewiesen werden (nicht gezeigt).

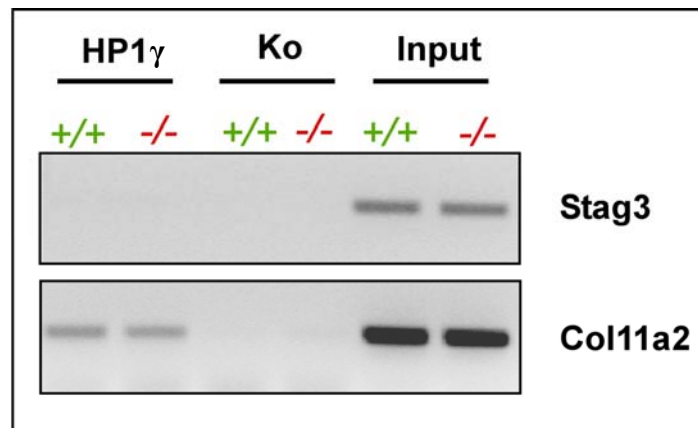


Abbildung 4.23: HP1 γ bindet nicht an den Stag3 Promotor

Chromatin aus embryonalen E2f6^{-/-} und Kontrollfibroblasten wurde präpariert. ChIPs wurden mit spezifischen Antikörpern zur Detektion von HP1 γ durchgeführt. Mit einer PCR wurde ein Abschnitt aus dem Stag3 bzw. aus dem Col11a2 Promotor amplifiziert. Die ChIPs wurden mit einem Ansatz ohne Antikörper kontrolliert (Kontrolle; Ko). Der Input entspricht 1% der für die ChIPs eingesetzten Chromatinmenge und diente als Kontrolle.

Zur Untersuchung der Bindung von Polycomb Proteinen an den Stag3 Promotor wurden ChIPs mit Antikörpern gegen die PRC-1 Polycomb Proteine Ring1A, Ring1B, M33 und RYBP (zur Verfügung gestellt von M. Vidal und M.v. Lohuizen) durchgeführt. Wie in Abbildung 4.24 gezeigt, konnte keine Bindung von Ring1a oder M33 an den Stag3 Promotor gezeigt werden, jedoch ist unklar, ob diese Antikörper für die Verwendung in ChIPs geeignet sind. Im Gegensatz dazu gelang jedoch der Nachweis von RYBP in Abhängigkeit von E2F6 auf dem Stag3 Promotor. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit der beschriebenen in-vitro Interaktion von E2F6 mit RYBP (Trimarchi *et al.*, 2001).

Zusammenfassend lassen diese Beobachtungen vermuten, dass die E2F6 abhängige Repression des Stag3 Promotors eine sequenzspezifische Rekrutierung von Polycomb Proteinen beinhalten könnte.

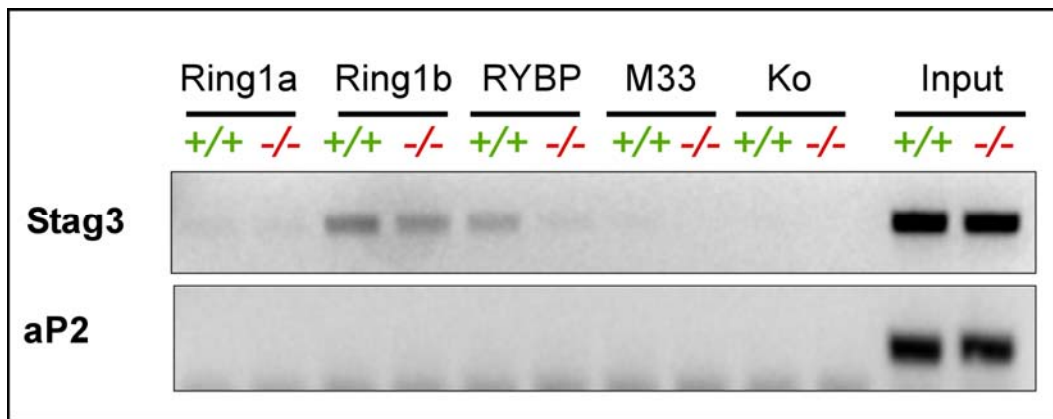


Abbildung 4.24: RYBP bindet an den Stag3 Promotor

Chromatin aus embryonalen E2f6^{-/-} und Kontrollfibroblasten wurde präpariert. ChIPs wurden mit spezifischen Antikörpern gegen Ring1a, Ring1b, RYBP und M33 durchgeführt. Mit einer PCR wurde ein Abschnitt aus dem Stag3 bzw. aus einem Kontrollabschnitt im aP2 Promotor amplifiziert. Die ChIPs wurden mit einem Ansatz ohne Antikörper kontrolliert (Ko). Der Input entspricht 1% der für die ChIPs eingesetzten Chromatinmenge und diente als Kontrolle.

4.5.5 Der Stag3 Promotor ist in E2f6^{-/-} Zellen acetyliert

Die Acetylierung terminaler Lysinreste von Histonproteinen induziert eine gelockerte Struktur zwischen DNA und Histonen und damit eine geöffnete Chromatinstruktur, die eine Anlagerung der basalen Transkriptionsmaschinerie ermöglicht (siehe 1.3.2).

Smc112 und Stag3 sind in E2f6^{-/-}, nicht jedoch in E2f6^{+/+} Fibroblasten exprimiert. Daher sollte untersucht werden, ob die Promotoren von Smc112 und Stag3 in E2f6^{-/-} Fibroblasten im Vergleich zu den Kontrollzellen acetyliert sind. Hierzu wurden ChIPs mit spezifischen Antikörpern durchgeführt, die eine Acetylierung von Lysinresten im Histon H3 bzw. Histon H4 erkennen (siehe 3.7.8). Anschließend wurde mit einer PCR ein Fragment aus dem Stag3 Promotor amplifiziert.

Dabei zeigte sich, dass in E2f6^{-/-} Fibroblasten Histon H3 am Stag3 Promotor stärker acetyliert ist als in Kontrollzellen (Abbildung 4.25). Im Gegensatz dazu ist die Acetylierung des Histon H4 in E2F6 defizienten Fibroblasten am Stag3 Promotor nicht verändert. In einem Bereich vier Kilobasen abwärts vom Stag3 Promotor wurde keine veränderte Acetylierung im Histon H3 oder H4 identifiziert.

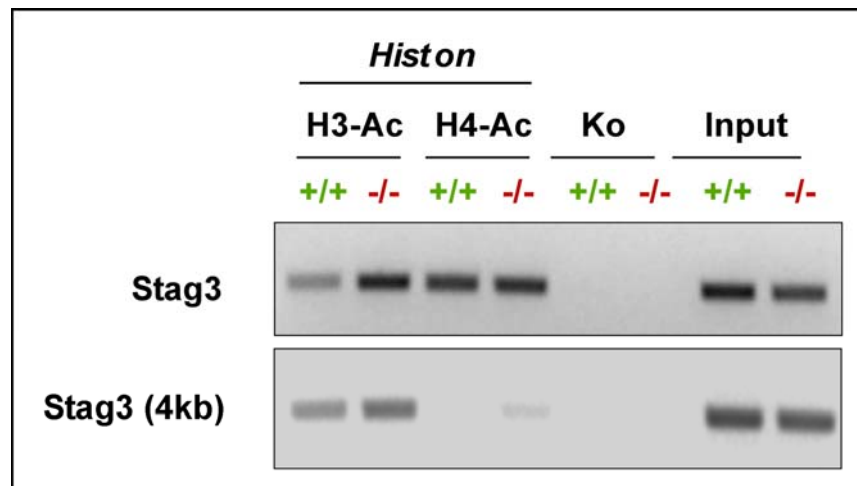


Abbildung 4.25: Der Stag3 Promotor ist in Abhängigkeit von E2F6 acetyliert

Chromatin aus embryonalen E2f6^{-/-} und Kontrollfibroblasten wurde präpariert. ChIPs wurden mit spezifischen Antikörpern zur Detektion von acetylierten Histon H3 (H3-Ac) bzw. Histon H4 (H4-Ac) durchgeführt. Mit einer PCR wurde ein Abschnitt aus dem Stag3 bzw. aus einem Kontrollabschnitt vier Kb abwärts im Stag3 Gen amplifiziert. Die ChIPs wurden mit einem Ansatz ohne Antikörper kontrolliert (Kontrolle; Ko). Der Input entspricht 1% der für die ChIPs eingesetzten Chromatinmenge und diente als Kontrolle.

Zusammengefasst konnte gezeigt werden, dass der Stag3 Promotor in E2f6^{-/-} Zellen in Korrelation mit einer Stag3 Expression acetyliert ist, während in E2f6^{+/+} Zellen in Korrelation mit einer Repression eine spezifische Methylierung identifiziert werden konnte. Daraus ergibt sich die Vermutung, dass die E2F6 vermittelte Repression zunächst die Aktivität von Histondeacetylasen benötigt, um nachfolgend eine Methylierung terminaler Lysinreste zur stabilen Repression zu ermöglichen.

4.5.6 Die E2F6 vermittelte Repression von Stag3 und Smc112 ist abhängig von Histondeacetylasen und einer DNA Methylierung

Um die Funktion von Histondeacetylasen in der E2F6 abhängigen Repression zu untersuchen, wurden E2f6^{+/+} Fibroblasten für 16 Stunden mit 2 μ M Trichostatin A (TSA) behandelt (siehe 3.2.11). TSA inhibiert die Aktivität zellulärer Histondeacetylasen. Anschließend wurde die Gesamt-RNA dieser Zellen isoliert, mit einer reversen Transkription in eine cDNA umgeschrieben und mit einer PCR seimiquantitativ analysiert (siehe 3.5.2.1 und 3.6.1). Dabei konnte eine signifikante Expression von Stag3 in E2f6^{+/+} Fibroblasten nach Behandlung mit TSA detektiert werden (siehe Abbildung 4.26). Dies zeigt, dass die stabile Repression der Stag3 Expression in somatischen Zellen die Aktivität von Histondeacetyla-

sen erfordert. Gleichzeitig konnte für Smc112 nach TSA Behandlung keine signifikante Expression detektiert werden.

Eine Analyse des Stag3 und des Smc112 Promotors zeigte eine Häufung von CpG Dinukleotiden (*CpG island*; <http://ccnt.hsc.usc.edu/cpgisland/cpg.cgi>). Diese überdeckte auch den Bereich der zuvor beschriebenen E2F6 Bindestelle im Stag3 Promotor. CpG Dinukleotide werden durch DNA-abhängige-Methyltransferasen methyliert. Diese DNA Methylierung bildet neben der zuvor beschriebenen spezifischen Histonmethylierung einen weiteren epigenetischen Mechanismus zur stabilen Transkriptionssinhibition (Jaenisch und Bird, 2003).

Um die Rolle der DNA Methylierung in der Transkriptionssinhibition von Smc112 und Stag3 zu untersuchen, wurden E2f6^{+/+} Fibroblasten mit 5'Aza-2'Deoxyctidin (5'Aza) behandelt (siehe 3.2.11). Dieses Cytidinanalog wird während der Replikation in die DNA inkorporiert und kann durch die chemische Modifizierung durch DNA-Methyltransferasen nicht methyliert werden. Die Behandlung erfolgte mit 5µM 5'Aza über 72 Stunden und wurde wegen der niedrigen Stabilität des 5'-Aza alle 24 Stunden erneuert.

Wie in Abbildung 4.26 gezeigt, konnte keine signifikante Expression von Smc112 und Stag3 nach Behandlung mit 5'Aza in E2f6^{+/+} Fibroblasten detektiert werden. Deshalb wurde in einem zweiten Ansatz die kombinatorische Wirkung einer Blockierung der Histondeacetylasen und der DNA Methylierung untersucht. Hierzu wurden E2f6^{+/+} Fibroblasten zunächst für 72 Stunden mit 5µM 5'Aza behandelt, in den letzten 16 Stunden erfolgte die Behandlung mit TSA wie zuvor beschrieben (siehe 3.2.11). Wie in Abbildung 4.26 zu erkennen, konnte nun eine signifikante Expression von Smc112 in E2f6^{+/+} Fibroblasten detektiert werden. Außerdem konnte eine Verstärkung der Expression von Stag3 im Vergleich zu einer Behandlung mit TSA oder 5'-Aza- alleine beobachtet werden. Somit führt eine Blockierung der DNA Methylierung und eine gleichzeitige Inhibition der Histondeacetylierung in E2f6^{+/+} Fibroblasten zu einem synergistischen Effekt und zu einer Expression von Smc112 und Stag3.

Daraus kann gefolgert werden, dass eine Histondeacetylierung und eine DNA Methylierung notwendig sind, um die Expression der meiotischen Gene Smc112 und Stag3 zu inhibieren.

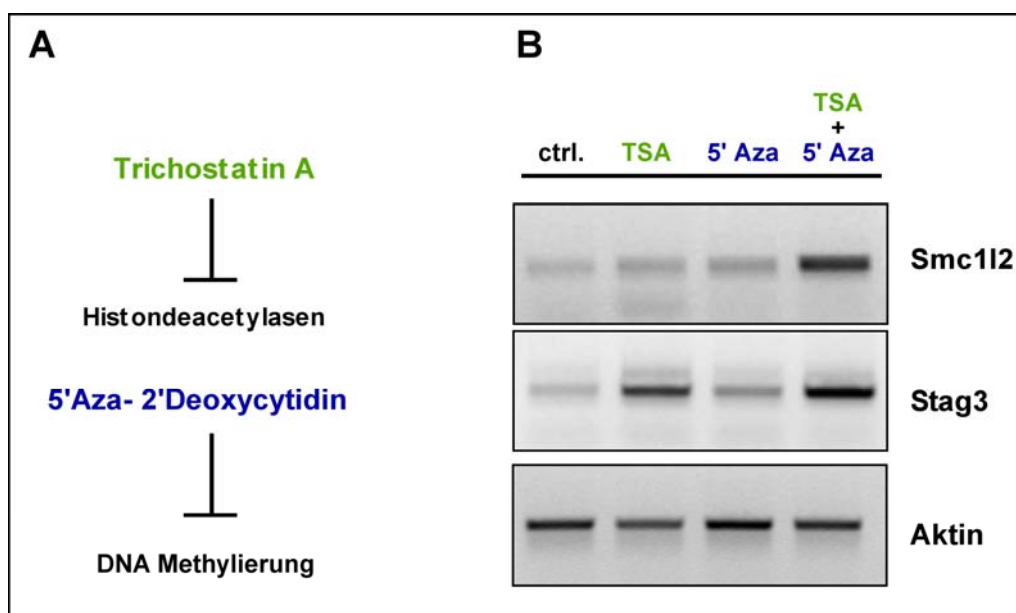


Abbildung 4.26: Die Funktion von Histondeacetylasen und der DNA Methylierung in der Smc112 und Stag3 Repression in E2f6^{+/+} Fibroblasten

(A) Trichostatin A (TSA) blockiert die Aktivität von Histondeacetylasen, 5'Aza-2'Deoxyctidin (5'Aza) blockiert die DNA Methylierung (B) E2f6^{+/+} Fibroblasten wurden für 16 Stunden mit 2 μ M TSA, für 72 Stunden mit 5 μ M 5'Aza oder für 72 Stunden mit 5 μ M 5'Aza und die letzten 16 Stunden gleichzeitig mit 2 μ M TSA (TSA+ 5'-Aza) behandelt. Gesamt-RNA aus den behandelten Zellen wurde isoliert, cDNA synthetisiert und die Expression von Smc112 und Stag3 mit einer PCR überprüft. Wie die PCR für Aktin zeigt, wurde in allen Proben die gleiche Menge an Ausgangsmaterial verwendet.

5 Diskussion

Anhand von Mausmodellen konnten für E2F Proteine *in-vivo* spezifische Funktionen in der Mausentwicklung und der Regulation von Zellproliferation und Zelldifferenzierung beschrieben werden (deGregori, 2002; Trimarchi und Lees, 2002). Um die biologische Funktion von E2F6 in der Regulation des Zellzyklus und in der Entwicklung der Maus zu untersuchen, wurden im Rahmen dieser Arbeit E2F6 defiziente Mäuse untersucht und charakterisiert. Diese zeigten neben einem Defekt in der Spermatogenese eine veränderte Körpersegmentierung in Form von posterioren homeotischen Transformationen des Skelettes. Weiterhin konnten durch die Untersuchung der Genexpression E2F6 defizienter primärer embryonaler Fibroblasten E2F6 regulierte Gene identifiziert werden. Anhand dieser Zielgene konnten Hinweise für einen aktiven, durch Chromatinmodifikationen vermittelten Mechanismus der E2F6 Repression erhalten werden.

5.1 E2F6 in der Entwicklung

5.1.1 E2F6 ist nicht essentiell für die murine Embryonalentwicklung

E2F6 defiziente Mäuse sind lebensfähig, werden in der nach Mendel erwarteten Häufigkeit geboren, zeigen eine normale postnatale Entwicklung und sind fruchtbar (siehe 4.1). Dies lässt vermuten, dass E2F6 nicht essentiell für die Embryonal- oder die postnatale Entwicklung der Maus ist.

Da E2F6 ein *Pocket* Protein unabhängiger transkriptioneller Repressor ist, könnte E2F6 *in-vivo* eine tumorsupressorische Funktion durch die Inhibition von E2F regulierten Zellzyklusgenen haben. E2F6 defiziente Mäuse entwickelten jedoch in einem Zeitraum von zwei Jahren keine auffällige Häufung von Tumoren oder anderen Erkrankungen. Allerdings ist denkbar, dass E2F6 ein schwacher Tumorsupressor ist und somit innerhalb der Lebenszeit der Maus keine Häufung an Tumoren beobachtet werden kann. Außerdem könnte erst der spontane, akute Verlust von E2F6 in ausdifferenziertem Gewebe zu einem Tumorphänotyp führen.

Die makroskopische und histologische Untersuchung von Organen aus E2F6 defizienten Mäusen bestätigte den unauffälligen Phänotyp E2F6 defizienter Mäuse. Es konnten keine Defekte in Aufbau und Funktion verschiedener Organe beobachtet werden. Eine Ausnahme bildeten die posterioren homeotischen Transformationen des Skelettes sowie eine Stö-

rung der Spermatogenese in *E2f6*^{-/-} Männchen. Eine Funktion von E2F6 in diesem entwicklungs- und gewebespezifischen Kontext wird anschließend diskutiert.

Zwar liefert der milde Phänotyp E2F6 defizienter Mäuse keine Evidenz für eine essentielle Funktion von E2F6 in der murinen Embryonal- und Postnatalentwicklung, jedoch ist möglich, dass inhibitorische E2F/*Pocket* Protein Komplexe für die Deletion von E2F6 funktionell kompensieren. Untersuchungen anderer E2F defizienter Mäuse ergaben Hinweise auf eine derartige funktionelle Redundanz innerhalb der E2F Proteinfamilie (deGregori, 2002). So sind E2F4 oder E2F5 defiziente Mäuse lebensfähig, zeigen aber organspezifische Defekte (Rempel *et al.*; 2000; Lindeman 1998). Im Gegensatz dazu sterben jedoch *E2f4*^{-/-}/*E2f5*^{-/-} Mäuse in der späten Embryonalentwicklung, so dass eine funktionelle Redundanz von E2F4 und E2F5 angenommen werden kann (Gaubatz *et al.*, 2000; siehe 1.3.4). Ein möglicher Ansatz zur Klärung einer überlappenden Funktion inhibitorischer E2F/*Pocket* Protein Komplexe mit E2F6 wäre die Kreuzung einer *E2f4*^{-/-} oder *E2f5*^{-/-} mit *E2f6*^{-/-} Mäusen.

Weiterhin ist denkbar, dass die E2F6 Defizienz *in-vivo* durch das erst kürzlich identifizierte E2F7 funktionell kompensiert wird. Dafür spricht, dass E2F7 in Analogie zu E2F6 *in-vitro* ebenfalls ein *Pocket* Protein unabhängiger transkriptioneller Repressor ist (de Bruin *et al.*, 2003; Di Stefano *et al.*, 2003; Logan *et al.*, 2004; siehe 1.4.1). Die Herstellung und Charakterisierung von E2F7 Deletionsmutanten und, sofern möglich, die Kreuzung mit E2F6 defizienten Mäusen könnten Aufschluss über die Funktion von E2F7 geben, und es könnte eine mögliche Redundanz mit E2F6 untersucht werden.

5.1.2 Posteriore homeotische Transformationen in E2F6 defizienten Mäusen

In E2F6 defizienten Mäusen konnten posteriore homeotische Transformationen entlang der antero-posterioren Achse des Skelettes identifiziert werden (siehe 4.3). Dies bedeutet, dass ein Segment der Körperachse die Morphologie eines weiter kaudal lokalisierten Segmentes zeigt (Bateson, 1894; Veraksa *et al.*, 2000). In *E2f6*^{-/-} Mäusen wurde die Transformation des 13. Thorakalwirbels zum 1. Lumbalwirbel und des 6. Lumbalwirbels zum 1. Sakralwirbel beobachtet (siehe Abbildung 4.10 und Tabelle 4.3).

Diese Segmentverschiebungen ähneln auffällig den posterioren homeotischen Transformationen, die in *Bmi1*, *Mel18*, *Rae28* bzw. *M33* Polycomb Protein defizienten Mäusen beobachtet wurden (van der Lugt *et al.*, 1994; Akasaka *et al.*, 1996; Coré *et al.*, 1997; Takihara

et al., 1997). Somit ergänzen diese Beobachtungen die von Trimarchi *et al.* und Ogawa *et al.* gezeigte Interaktion von E2F6 mit Polycomb Proteinen und liefern erstmals Evidenz für eine funktionelle Interaktion von E2F6 mit Polycomb Proteinen *in-vivo* (Trimarchi *et al.*, 2001; Ogawa *et al.*, 2002).

Es ist weitestgehend unklar, wie Polycomb Proteine an DNA binden (siehe 1.4.2.1). Die Ähnlichkeiten der Phänotypen E2F6 und Polycomb defizienter Mäusen lassen vermuten, dass E2F6 eine Funktion in einer Rekrutierung eines Polycomb Proteinkomplexes an Promotoren Polycomb regulierter Gene hat.

Die homeotischen Transformationen in *E2f6*^{-/-} Mäusen sind, im Gegensatz zu Polycomb defizienten Mäusen, auf den kaudalen Bereich der Körperlängsachse beschränkt (van der Lugt *et al.*, 1994; Akasaka *et al.*, 1996; Coré *et al.*, 1997; Takihara *et al.*, 1997). Möglicherweise werden Polycomb Proteinkomplexe durch verschiedene Transkriptionsfaktoren sequenzspezifisch an Promotoren Polycomb regulierter Gene rekrutiert und dadurch eine DNA Bindung vermittelt. So kann spekuliert werden, dass E2F6 einen Polycomb Komplex an einen oder mehrere Polycomb regulierte Promotoren rekrutiert und damit eine dauerhafte und stabile Repression der Transkription an diesem Promotor induziert.

5.1.3 Regulation von Hox Genen durch E2F6?

Polycomb Proteine vermitteln die stabile Repression homeotischer Gene (Hox Gene). Die posterioren homeotischen Transformationen Polycomb defizienter Mäuse korrelieren mit einer anterioren Verschiebung der Expressionsgrenzen einiger Hox Gene entlang der Längsachse (Cilio *et al.*, 2001; Schumacher *et al.*, 1997; van der Lugt *et al.*, 1996; Jacobs *et al.*, 2002; Akasaka *et al.*, 2001; siehe 1.4.2.1). Daher ist denkbar, dass E2F6 Polycomb Komplexe an die Promotoren von Hox Genen rekrutiert. Überraschenderweise ergab jedoch eine vergleichende Untersuchung der Expressionsgrenzen von Hox B3, B8, C8, C9, D9, C10 und C11 in 9.5 Tage alten *E2f6*^{-/-} und *E2f6*^{+/+} Embryonen keinen Hinweis auf eine Translokation der Expressionsgrenzen (siehe 4.3.2).

Diese Analyse war allerdings auf eine geringe Anzahl an Hox Genen begrenzt. Im murinen Genom existieren 39 verschiedene Hox Gene, die in vier genomischen Klustern (Hox A, Hox B, Hox C und Hox D) mit jeweils 9-11 Genen organisiert sind. Nach dem Prinzip der Kolinearität werden die im Gencluster 3' lokalisierten Hox Gene im kranialen Bereich, die im 5' Bereich des Klusters lokalisierten Hox Gene im kaudalen Bereich exprimiert (Cilio

et al., 2001; Graham *et al.*, 1989). Bevor daher eine Funktion von E2F6 in der Hox Genregulation ausgeschlossen werden kann, müssen die anterioren Expressionsgrenzen der Hox Gene, die in den kaudalen Anteilen der embryonalen Achse exprimiert sind, untersucht werden.

In dieser Arbeit wurde die Hox Expression am Tag 9.5 der Embryonalentwicklung untersucht. Jedoch beobachteten van der Lugt *et al.* eine Verschiebung der anterioren Expressionsgrenzen bestimmter Hox Gene in *Bmi1* defizienten 11.5 und 12.5 Tage alten Embryonen, während eine Verschiebung am Tag 9.5 der Embryonalentwicklung noch nicht festzustellen war (van der Lugt *et al.*, 1996). Möglicherweise ist daher eine Überprüfung der Expressionsgrenzen von Hox Genen in *E2f6*^{-/-} Embryonen zu verschiedenen Zeitpunkten der Embryonalentwicklung notwendig.

Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Hox Expressionsgrenzen am Tag 9.5 der Embryonalentwicklung in *E2f6*^{-/-} Embryonen korrekt lokalisiert sind, jedoch zu einem früheren Zeitpunkt der Embryonalentwicklung verschoben waren. Eine derartige transiente Translokation der Expressionsgrenzen könnte, trotz einer nachfolgenden Korrektur, zu homeotischen Transformationen führen (del Mar Lorente *et al.*, 2000; Bel *et al.*, 2000).

Außerdem könnte in *E2f6*^{-/-} Embryonen lediglich die Expressionsstärke von Hox Genen, nicht jedoch die Expressionsgrenze, verändert sein. Um die Intensität der Expression von Hox Genen zu quantifizieren, müssten allerdings alternative Methoden zur in-situ Hybridisierung, wie z.B. eine quantitative PCR, angewendet werden.

Schließlich ist nicht auszuschließen, dass E2F6 selbst ein durch Hox Proteine reguliertes Zielgen darstellt und auf diese Weise an Hox vermittelten Entwicklungsprozessen beteiligt ist.

Um die Rolle von E2F6 in der Interaktion mit Polycomb Proteinen besser zu verstehen, könnten Kreuzungen mit Polycomb defizienten Mäusen durchgeführt werden. Möglicherweise würde dies zu synergistischen Effekten in der Entstehung homeotischer Transformationen in diesen Mäusen führen, die eine funktionelle Interaktion von E2F6 und Polycomb Proteinen bestätigen. In diesem Zusammenhang zeigt eine Kreuzung von *Mel18*^{-/-} mit *Bmi1*^{-/-} Mäusen eine Synergie in Lokalisation und Penetranz der posterioren homeotischen Transformationen (Akasaka *et al.*, 2001). Gleichzeitig könnte anhand dieser Doppelmutanten die Expression spezifischer Hox Gene auf einen synergistischen Effekt in der Translokation der anterioren Expressionsgrenze untersucht werden. So ist in *Bmi1*^{-/-} Embryonen die Expressionsgrenze von Hox C9 um ein Segment, in *Bmi1*^{-/-}, *M33*^{-/-} Embryonen jedoch um vier Segmente nach kranial verschoben (Bel *et al.*, 2000). Damit wäre ein Nach-

weis einer deregulierten anterioren Expressionsgrenze zum einen experimentell deutlich erleichtert und zum anderen die Funktion von E2F6 in der Hox Genexpression eindeutig belegt.

5.2 E2F6 und die Regulation des Zellzyklus

In verschiedenen Studien wurde eine mögliche Funktion von E2F6 im Zellzyklus postuliert (Cartwright *et al.*, 1998; Gaubatz *et al.*, 1998; Ogawa *et al.*, 2002). E2F6 interagiert außerdem mit den Polycomb Protein Bmi1 (Trimarchi *et al.*, 2001; siehe 1.4.2.1), dass die Expression von p16^{INK4a} und p19^{ARF} inhibiert (Jacobs *et al.*, 1999). Da Bmi1 keine DNA Bindedomäne besitzt, wurde spekuliert, dass E2F6 die Rekrutierung von Bmi1 an den Ink4a/ARF Lokus vermittelt. Der Promotor von p19^{ARF} besitzt E2F Bindestellen und p19^{ARF} wurde bereits als ein E2F Zielgen identifiziert (Bates *et al.*, Nature 1998).

Die Untersuchungen zur E2f6^{-/-} Fibroblasten ergaben jedoch, dass E2F6 weder für die Zellproliferation oder das Zellwachstum, noch für die Induktion der replikativen oder onkogenen Seneszenz benötigt wird:

- (1) E2F6 defiziente primäre embryonale Fibroblasten proliferieren normal und zeigen eine zu den Kontrollzellen identische Zellzyklusverteilung (Abbildung 4.4 und 4.5).
- (2) Untersuchungen von serumgehungenen E2f6^{-/-} Fibroblasten ergaben keine *in-vivo* Evidenz für eine Funktion von E2F6 in der G0 Phase (Abbildung 4.6).
- (3) Während der Kultivierung E2F6 defizienter primärer Fibroblasten konnte keine Evidenz für eine im Vergleich zu Kontrollzellen verfrühte Induktion der replikativen Seneszenz erhalten werden (Abbildung 4.7 (A)).
- (4) Dies wurde durch die Beobachtung bestätigt, dass keine erhöhte Expression von p16^{INK4a} und p19^{ARF} in E2f6^{-/-} Fibroblasten nachgewiesen werden konnte (Abbildung 4.7 (B)).
- (5) Auch die Induktion der Seneszenz durch eine Überexpression einer konstitutiv aktiven Mutante des Ras Onkoproteins (onkogene Seneszenz) verlief in E2F6 defizienten Fibroblasten normal (Abbildung 4.8).

Wie bereits in Zusammenhang mit einer Funktion von E2F6 in der Embryonalentwicklung diskutiert, ist auch hier denkbar, dass inhibitorische E2F/*Pocket* Protein Komplexe für die Deletion von E2F6 kompensieren. Um dies zu bestätigen, wäre eine detaillierte Untersu-

chung von E2F-*Pocket* Proteinkomplexen in E2f6^{-/-} Zellen in verschiedenen Zellzyklusphasen notwendig.

Eine weitere Erklärung für die normale Proliferation E2F6 defizienter Fibroblasten wäre auch hier, dass E2F6 und der *Pocket* Protein unabhängige Repressor E2F7 eine überlappende Funktion in der Zellzyklusregulation haben (de Bruin *et al.*, 2003; Di Stefano *et al.*, 2003; Logan *et al.*, 2004) und die E2F6 Defizienz somit durch E2F7 kompensiert werden kann.

Weiterhin ist nicht auszuschließen, dass der E2F6 Proteinkomplex in E2F6 defizienten Fibroblasten durch das Max/Mga Heterodimer an Promotoren mit einer E-Box Sequenz binden kann (La Thangue, 2002; Ogawa *et al.*, 2002; siehe Einleitung). Es wäre daher notwendig zu untersuchen, ob Komponenten des Proteinkomplexes, wie z.B. Max, Mga, G9a oder HP1 γ in E2F6 defizienten Fibroblasten weiterhin auf den Promotoren dieser Zellzyklusgene in G0 identifiziert werden können.

Die normale Induktion der replikativen und der onkogenen Seneszenz, zusammen mit der normalen Expression von p16^{INK4a} und p19^{ARF} in E2F6 defizienten Fibroblasten widerspricht der angenommenen Funktion von E2F6 in der Repression des INK4a/ARF Lokus durch die Rekrutierung von Bmi1 an den Ink4a/ARF Promotor (Trimarchi *et al.*, 2001).

Es ist jedoch bekannt, dass der INK4a/ARF Lokus durch eine Vielzahl von anderen Transkriptionsfaktoren reguliert wird. Möglicherweise vermitteln diese Mechanismen auch in E2f6^{-/-} primären Fibroblasten die Ink4a/ARF Repression und die replikative Seneszenz. In diesem Zusammenhang zeigten Aslanian *et al.* in einer kürzlich veröffentlichten Studie eine Inhibition des p19^{ARF} Promotors durch einen inhibitorischen E2F3 Komplex. ChIPs bestätigten die spezifische Bindung von E2F3 auf dem p19^{ARF} Promotor (Aslanian *et al.*; 2004). Im Einklang dazu ist die Expression von p19^{ARF}, p53 und p21 in E2F3 defizienten primären Fibroblasten signifikant erhöht.

Außerdem zeigten Gil *et al.*, dass der Ink4a/ARF Promotor durch das Polycomb Protein Cbx7 reguliert wird, das die Induktion der replikativen Seneszenz in humanen primären Prostata Epithelzellen unabhängig von Bmi1 blockiert (Gil *et al.*, 2004).

Zusammengefasst ist zu vermuten, dass E2F6 *in-vivo* nicht an der Regulation des Ink4a/ARF Promotors beteiligt ist.

5.3 E2F6 regulierte Gene

5.3.1 E2F6 vermittelt die Repression meiotischer Kohäsine in somatischen Zellen

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein systematischer Ansatz verwendet, um mögliche E2F6 regulierte Gene zu identifizieren, die weiter Aufschluss über eine mögliche Funktion von E2F6 *in-vivo* geben können.

Mit einer Expressionsanalyse über einen *cDNA Microarray* wurden die Gene *Smc112* (*Structural Maintenance of Chromosome 1 like 2*), *Stag3* (*Stromal Antigen 3*) und das noch nicht charakterisierte Gen *XM_196054* als E2F6 regulierte Gene identifiziert. RT-PCR und Western Blot Untersuchungen bestätigten, dass *Smc112*, *Stag3* und *XM_196054* in somatischen *E2f6*^{-/-} Fibroblasten signifikant und reproduzierbar exprimiert waren, während in Kontrollzellen keine Expression nachweisbar war (siehe 4.4). Dies führt zu der Überlegung, dass eine biologische Funktion von E2F6 in der Repression der meiotischen Kohäsine *Smc112* und *Stag3* liegt. Diese Vermutung konnte durch den Nachweis einer *Smc112* und *Stag3* Expression in E2F6 defizienten, adulten, somatischen Zellen unterstützt werden. Jedoch war in diesem Gewebe keine Expression von *XM_196054* nachweisbar. Eine genaue Untersuchung der Expression und Funktion von *XM_196054* wird zeigen, wie dieses Gen in adultem Gewebe reguliert ist.

Während der Anfertigung dieser Arbeit wurden von Oberley *et al.* E2F6 spezifische Zielgene in humanen Zellen identifiziert und publiziert. In dieser Studie wurden 293T Zellen verwendet und in einer Kombination aus Chromatinimmunpräzipitationen (ChIPs) und einem promotorspezifischen *Microarray* u.a. das Tumorsuppressorgen BRCA-1, das Heterochromatin Protein HP1 und das Chromatin-assoziierte Protein RbAp48 als E2F6 Zielgene identifiziert. Eine Bestätigung dieser Ergebnisse erfolgte durch den direkten Nachweis von E2F6 auf den Promotoren dieser Gene (Oberley *et al.*, 2003; siehe 1.4.2.4). Überraschenderweise konnte keine deregulierte Expression von BRCA1, HP1 oder RbAp48 in murinen E2F6 defizienten primären embryonalen Fibroblasten beobachtet werden (Abbildung 4.16). Möglicherweise deutet dieser Befund auf eine speziesspezifische Funktion von humanem und murinem E2F6 hin. Außerdem verwendeten Oberley *et al.* humane transformierte Zellen (293T), im Gegensatz zu den in dieser Arbeit verwendeten murinen primären embryonalen Fibroblasten. In 293T Zellen werden die *Pocket* Proteine pRb, p107 und p130 durch die Expression des „*large T* – Antigens“ gebunden, so dass keine inhibitorischen E2F/*Pocket* Protein Komplexe gebildet werden. Möglicherweise bindet unter diesen Be-

dingungen E2F6 an einige E2F regulierte Promotoren, wie z.B. dem BRCA1 Promotor und vermittelt eine Repression (Wang *et al.*, 2001). Ein möglicher experimenteller Ansatz zur Klärung dieser Frage wäre die Expression des „large T-Antigens“ und/oder des E1A Onkoproteins in E2f6^{-/-} Fibroblasten und eine nachfolgende Analyse der BRCA-1, HP1 und RbAp48 Expression.

5.3.2 Folgen der Expression von Smc112 und Stag3 in E2F6 defizienten Zellen

Smc112 und Stag3 sind meiotische Kohäsine und werden ausschließlich in meiotischen Geweben exprimiert. Revenkova *et al.* identifizierten Smc112 (*Smc1β*) als eine Meiose spezifische Isoform von Smc1 (*Smc1α*) (Revenkova *et al.*, 2001). Stag3 wiederum wurde als ein Meiose spezifisches Homolog der mitotischen Kohäsine SA-1/SA-2 identifiziert (Pezzi, N. *et al.*, 2000; Prieto *et al.*, 2001). Für das noch unbekannte Gen *XM_196054* konnte ebenfalls eine Expression ausschließlich im Hodengewebe nachgewiesen werden. Dies ist ein erster Hinweis darauf, dass es sich ebenfalls um ein Meiose spezifisches Gen handeln könnte (Andrea Rubeck; Diplomarbeit).

Die normale Zellproliferation und die Verteilung der Zellzyklusphasen von E2F6 defizienten Fibroblasten zeigen, dass die Überexpression der meiotischen Kohäsine Smc112 und Stag3 in mitotischen Zellen tolerierbar ist. Da außerdem im Rahmen der FACS Messungen keine signifikante Häufung aneuploider Zellen festgestellt werden konnte, scheint kein Defekt in der Chromosomenadhäsion in mitotischen Zellen vorzuliegen (siehe 4.2). Erste Untersuchungen zu Anzahl und Struktur von Metaphasechromosomen bestätigen dies (nicht gezeigt). Zudem verlassen E2F6 defiziente Fibroblasten einen Nokodazol induzierten Metaphase Arrest mit der gleichen Kinetik wie die Kontrollzellen (nicht gezeigt). Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass ein möglicher Defekt nur sehr schwach ist und daher technisch schwer nachweisbar ist.

Ursachen für die Tolerierung der Smc112 und Stag3 Überexpression in somatischen Zellen könnten sein:

(1) Es sind nicht alle Komponenten des meiotischen Kohäsinkomplexes in E2f6^{-/-} Fibroblasten exprimiert, so dass sich kein funktioneller meiotischer Kohäsinkomplex in somatischen E2f6^{-/-} Zellen bilden kann. Es konnte keine Expression von REC8, dem meiotischen Homolog des RAD21 Proteins, in E2F6 defizienten Fibroblasten nachgewiesen werden (Molnar *et al.*, 1995; Klein *et al.*, 1999; nicht gezeigt). REC8 bildet die struktu-

relle Grundlage zur Bildung des synaptonemalen Komplexes in der Meiose I und wird ausschließlich in murinen Spermatozyten, Spermatiden und in Oozyten exprimiert (Eijpe *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2002).

(2) Sowohl meiotische als auch mitotische Kohäsine werden durch die APC induzierte Protease Separase gespalten und inaktiviert (Buonomo *et al.*, 2000; Petronczki und Naysmith, 2003). Somit wäre ein meiotischer Kohäsinkomplex in somatischen Zellen funktionell inaktivierbar und der Ablauf der Mitose nicht beeinträchtigt.

Gleichzeitig wirft die Beobachtung eines Spermatogenesedefektes in E2F6 defizienten Mäusen die Frage auf, inwiefern ein funktioneller Zusammenhang zwischen einer deregulierten Smc112 und Stag3 Expression und einer gestörten Spermatogenese besteht. Möglicherweise wird E2F6 für eine Regulation der Expression meiotischer Kohäsine während der Spermatogenese benötigt. So könnte mit in-situ Hybridisierungen auf Hodenschnitten die E2F6 Expression während der Spermatogenese untersucht und mit der Expression von Stag3 und Smc112 verglichen werden.

5.4 Der Mechanismus einer E2F6 vermittelten Repression meiotischer Kohäsine

Zu Beginn dieser Arbeit existierten zwei verschiedene Modelle einer E2F6 vermittelten Repression. Ogawa *et al.* postulierten einen aktiven E2F6 abhängigen Repressionsmechanismus, der durch Chromatinmodifikationen vermittelt wird (Ogawa *et al.*, 2002; siehe Einleitung). Demgegenüber steht das Kompetitionsmodell von Oberley *et al.*, in dem eine Repression durch E2F6 passiv durch Blockierung einer gleichzeitigen E2F1 Bindung an dieselbe E2F Konsensussequenz induziert wird (Oberley *et al.*, 2003).

5.4.1 E2F6 bindet an den Stag3 Promotor

Durch die Verwendung von Chromatinimmunpräzipitationen (ChIPs) konnte E2F6 auf dem Stag3 Promotor nachgewiesen werden (Abbildung 4.20). Somit ist anzunehmen, dass der Stag3 Promotor direkt durch E2F6 reguliert wird.

Ein Nachweis von E2F6 auf dem Stag3 Promotor gelang ebenfalls nach einer E2F6 Re-Expression in E2f6^{-/-} Fibroblasten. Dieser Nachweis korreliert mit einer Inhibition der

Stag3 Expression (Abbildung 4.20 und 4.17). Möglicherweise bedeutet dies, dass am Tag 13.5 der Embryonalentwicklung alle Faktoren für eine E2F6 vermittelte Repression vorliegen, so dass eine Inhibition des Stag3 Promotors nach E2F6 Expression möglich ist. Die Expression von Stag3 ist jedoch nicht vollständig inhibiert. Dies könnte zeigen, dass der nach Re-Expression von E2F6 induzierte E2F6 Repressionsmechanismus möglicherweise nicht dem endogenen Mechanismus entspricht. Eine interessante Frage wäre in diesem Zusammenhang, ob die Repression von Stag3 nach einer Re-Expression in E2F6 defizienten Zellen transient oder stabil angelegt ist und die Stag3 (und Smc112 bzw. *XM_196054*) Expression nach einer Anzahl von Passagen möglicherweise vollständig blockiert ist. Vermutlich wird die spezifische Bindung von E2F6 an den Stag3 Promotor durch ein E2F Konsensuselement vermittelt, das sowohl im Smc112 als auch im Stag3 Promotor identifiziert werden konnte (siehe 4.5.1; Diplomarbeit Andrea Rubeck). Interessanterweise zeigt E2F1 eine deutlich schwächere Bindung als E2F6 an dieses Konsensuselement im Smc112 Promotor (Diplomarbeit Andrea Rubeck). Im Einklang hierzu gelang bisher kein Nachweis von E2F1 auf dem endogenen Stag3 Promotor (nicht gezeigt). Diese Beobachtungen sprechen gegen die von Oberley *et al.* vermutete Kompetition zwischen E2F1 und E2F6 um dieselbe E2F Bindestelle in den Promotoren von Smc112 und Stag3.

5.4.2 E2F6 abhängige Chromatinmodifikationen

E2F6 bindet direkt an den endogenen Stag3 Promotor. Vor dem Hintergrund der Interaktion von E2F6 mit Histonmethyltransferasen wurde daher untersucht, ob durch die E2F6 Bindung Chromatinmodifikationen induziert werden, die eine E2F6 Repression vermitteln. In E2f6^{+/+} Fibroblasten konnte an den Promotoren von Smc112 und Stag3 durch Chromatinimmunpräzipitationen (ChIPs) eine E2F6 abhängige Di- und Trimethylierung von Histon Lysin 9, bzw. Lysin 27 (H3K9/K27) nachgewiesen werden. Mit Antikörpern, die spezifisch zwischen einer Mono-, Di- und Trimethylierung von Histon H3K9 oder H3K27 unterscheiden (Peters *et al.*, 2003), wurde eine signifikante Dimethylierung von H3K9 und eine gleichzeitige Trimethylierung von H3K27 am Stag3 Promotor in E2f6^{+/+} Fibroblasten gezeigt (siehe Abbildung 4.21 und 4.22). Die Methylierung von H3K9 und H3K27 ist eine epigenetische Modifikation auf transkriptionell reprimierten Promotoren (Lachner *et al.*, 2003). Die am Stag3 Promotor identifizierte E2F6 abhängige Histonmethyl-

lierung korreliert daher mit der fehlenden Expression von Smc112 und Stag3 in E2f6^{+/+} Fibroblasten.

Gleichzeitig wurde beobachtet, dass der Verlust von E2F6 zu einer verstärkten Acetylierung von Histon H3 am Stag3 Promotor in E2f6^{-/-} Fibroblasten führt (siehe Abbildung 4.25). Diese Beobachtung steht im Einklang mit einer verstärkten Stag3 Expression in E2f6^{-/-} Zellen, da die Acetylierung von Histon H3 mit einer geöffneten Chromatinstruktur und einer aktiven Transkription des Promotors korreliert (Sternier und Berger, 2000; Strahl und Allis, 2000; Kouzarides, 1999). Somit ist zu vermuten, dass die E2F6 abhängige Repression von Stag3 die Aktivität von Histondeacetylasen benötigt. Diese Vermutung wurde durch die Beobachtung bestätigt, dass eine Blockierung der Histondeacetylaseaktivität in E2f6^{+/+} Fibroblasten durch Trichostatin- A (TSA) eine signifikante Expression von Stag3 induzierte (siehe Abbildung 4.26).

Eine Verbindung zwischen der E2F6 Repression und einer DNA Methylierung ergab sich aus der Beobachtung, dass die simultane Blockierung der DNA Methylierung und der Histondeacetylasen sowohl zu einer verstärkten Stag3 Expression, als auch zu einer nun nachweisbaren Smc112 Expression in E2f6^{+/+} Fibroblasten führt (siehe Abbildung 4.26). Die enzymatische Methylierung von Cytosinen in CpG Dinukleotiden erfolgt durch DNA Methyltransferasen und ist an der transkriptionellen Inhibition und Heterochromatinbildung beteiligt (Jaenisch und Bird, 2003).

Zusammenfassend liefern diese Ergebnisse Evidenz, dass die E2F6 vermittelte Repression meiotischer Kohäsine durch die Aktivität von Histondeacetylasen, Histonmethyltransferasen und DNA Methylasen vermittelt wird.

5.4.3 Wie wird die Histonmethylierung am Stag3 Promotor vermittelt?

Die Identifizierung einer H3K9 und einer H3K27 Di- bzw. Trimethylierung am Smc112 und Stag3 Promotor in E2f6^{+/+} Fibroblasten führt zu der Frage, welches Enzym diese Methylierungen katalysiert. Denkbar ist, dass E2F6 eine Methyltransferase an die Promotoren meiotischer Kohäsine in somatischen Zellen rekrutiert und somit eine stabile Repression des Promotors induziert.

Mögliche Kandidaten hierzu bilden die Histonmethyltransferasen G9a und EuHMTase, die in dem von Ogawa *et al.* identifizierten E2F6 Komplex nachgewiesen wurden (Ogawa *et al.*, 2002; siehe Einleitung). G9a methyliert *in-vitro* H3K9 und H3K27, allerdings konnte

bisher *in-vivo* nur eine Spezifität für H3K9 gezeigt werden (Tachibana *et al.*, 2000; Tachibana *et al.*, 2001; Roopra *et al.*, 2004). Die von Ogawa *et al.* erstmals beschriebene EuHMTase zeigte *in-vitro* ausschließlich eine Spezifität für eine Histon H3K9 Methylierung (Ogawa *et al.*, 2002). Somit ließe sich zwar die H3K9 Dimethylierung im Stag3 Promotor durch die Aktivität von G9a oder der EuHMTase begründen, jedoch ist unklar, wie die H3K27 Methylierung katalysiert werden kann. Überraschenderweise waren in ersten Ansätzen weder G9a noch EuHMTase auf dem Promotor von Stag3 nachweisbar (nicht gezeigt). Gegen eine Funktion von G9a in der Regulation des Stag3 Promotors spricht ebenfalls die Beobachtung, dass Stag3 in G9a^{-/-} embryonalen Stammzellen nicht dereguliert ist (Y. Shinkai, persönliche Korrespondenz).

Alternativ könnte jedoch die E2F6 abhängige Methylierung durch das Polycomb Protein EZH2 vermittelt werden. EZH2 bildet die katalytische Untereinheit des Polycomb Proteinkomplex PRC-2 (Cao and Zhang, 2004; siehe 1.4.2.1). PRC-2 zeigt *in-vitro* und *in-vivo* eine Spezifität zur Methylierung von H3K27. In Ergänzung dazu konnten jedoch Czermin *et al.* und Kuzmichev *et al.* eine *in-vitro* Spezifität von PRC-2 zur Methylierung von H3K9 nachweisen (Cao *et al.*, 2002; Czermin *et al.*, 2002; Kuzmichev *et al.*, 2002; Muller *et al.*, 2002). Jedoch ist unklar, ob diese Ergebnisse möglicherweise mit Kreuzreaktionen der in diesen Studien verwendeten Antikörper oder mit Kontaminationen während der PRC-2 Aufreinigung zu begründen sind (Cao and Zhang, 2004).

Ein erster Hinweis für eine Funktion katalytischer Polycomb Proteine in der E2F6 vermittelten Repression ist die *in-vitro* Interaktion von E2F6 mit EZH2 und mit SUZ12, einer weiteren Komponente des PRC-2 Komplexes (nicht gezeigt). Ein direkter Nachweis dieser Polycomb Proteine auf dem Stag3 Promotor ist schwierig, da die hierzu zur Verfügung stehenden Antikörper für einen derartigen experimentellen Ansatz nicht geeignet sind. Daher sind alternative Methoden notwendig, um die funktionelle Verbindung zwischen E2F6 und katalytischen Polycomb Proteinen zu zeigen. Denkbar wäre die Etablierung einer *RNAi* basierenden Reduktion von EZH2 in E2f6^{+/+} Fibroblasten und einer nachfolgenden Untersuchung der Smc112 und Stag3 Expression.

Zusammengefasst bleibt somit zunächst unklar, welche Histonmethyltransferase eine E2F6 Repression vermittelt und ob E2F6 diese Methyltransferase an den Stag3, bzw. Smc112 Promotor rekrutiert.

5.4.4 Welche Funktion haben die Histonmethylierungen am Stag3 Promotor?

Die Dimethylierung von H3K9 bildet eine Bindestelle für die Chromodomäne des HP1 Proteins. Gleichzeitig wird vermutet, dass der PRC-2 Komplex an trimethyliertes H3K27 bindet (Lachner und Jenuwein, 2003).

Weder HP1 γ noch HP1 α binden an den Stag3 Promotor, obwohl gleichzeitig eine Bindung an den durch HP1 regulierten Col11a2 Promotor gezeigt werden konnte (Abbildung 4.23). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass HP1 nicht an der Repression von Stag3 beteiligt ist. Vermutlich binden andere Proteine, die eine Chromodomäne besitzen, an dimethyliertes H3K9 am Stag3 Promotor und inhibieren dadurch eine Stag3 Expression.

M33, ein Polycomb Protein aus dem PRC-2 Komplex, das eine Chromodomäne besitzt, konnte bisher nicht mit ChIPs auf dem Stag3 Promotor detektiert werden. Jedoch ist unklar, ob der verwendete M33 Antikörper für einen derartigen experimentellen Ansatz geeignet ist. Hinweise, dass ein Polycomb Komplex an den Stag3 Promotor bindet, konnte durch den Nachweis von RYBP (**R**ing1-**Y**Y1-**b**inding-**p**rotein) am Promotor erbracht werden. RYBP ist eine Komponente des PRC-2 Polycomb Komplexes. RYBP wurde von Trimarchi *et al.* bereits als ein E2F6 interagierendes Protein identifiziert und ist als ein transkriptioneller Repressor beschrieben worden (Trimarchi *et al.*, 2001; Garcia *et al.*, 1999).

5.4.5 Die E2F6 abhängige Repression und die Histondeacetylierung

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Histondeacetylasen an einer E2F6 vermittelten Repression beteiligt sind. Auch Polycomb Komplexe wurden zuvor bereits mit Histondeacetylasen in Verbindung gebracht: EED, ein PRC-2 Polycomb Protein, interagiert *in-vitro* und *in-vivo* mit Histondeacetylasen und eine Histondeacetylierung ist notwendig für eine Polycomb vermittelte Repression (van der Vlag *et al.*, 1999). Somit könnte spekuliert werden, dass E2F6 in einer Rekrutierung des PRC2 Komplexes eine Deacetylierung und eine nachfolgende Methylierung von H3K27 ermöglicht. Es sind jedoch weitere Untersuchungen notwendig, um zu klären, ob E2F6 direkt an der Histondeacetylierung beteiligt ist. Denkbar wäre auch, dass die Histondeacetylierung unabhängig von E2F6 durchgeführt wird und einer E2F6 vermittelten Histonmethylierung vorausgeht.

Eine weitere Komplexität der E2F6 abhängigen Repression ergibt sich aus der Beobachtung des synergistischen Effektes der Inhibition von Histondeacetylasen und der Blockierung einer DNA Methylierung. Dies weist auf eine mögliche funktionelle Verbindung dieses Chromatin und DNA Modifikationen am Smc112 und Stag3 Promotor hin. Eine mögliche Erklärung dieser Beobachtungen ist die Assoziation von DNA Methyltransferasen und MeCPs (*Methyl CpGs binding Proteins*) mit einer Aktivität zur Deacetylierung von Histonen (Jones *et al.*, 1998; Nan *et al.*, 1998; Ng und Bird, 1999; Robertson *et al.*, 2000; Fuks *et al.*, 2000; Fuks *et al.*, 2001).

5.4.6 Modell zur E2F6 vermittelten Repression

Zusammengefasst ergibt sich aus den in dieser Arbeit vorgestellten Beobachtungen folgendes Modell zur E2F6 vermittelten Repression:

- (1) E2F6 bindet spezifisch an ein E2F Konsenselement im Smc112 und Stag3 Promotor.
- (2) Durch diese Bindung werden E2F6 assoziierte Chromatin-modifizierende Enzyme an den Promotor von Stag3 und Smc112 rekrutiert. Dadurch wird eine Deacetylierung von Histonen katalysiert, die nachfolgend die spezifische H3K9 und H3K27 Methylierung durch Histonmethylasen ermöglicht.
- (3) Die spezifischen Methylierungen führen zur Bindung von Chromatin-assoziierten Proteinen, wie z.B. Polycomb Proteinen, die eine dauerhafte und vererbare Repression der Smc112 und Stag3 Expression vermitteln.
- (4) Schließlich könnten durch die Aktivität von DNA Methyltransferasen CpG Dinukleotide im Stag3 und Smc112 Promotor methyliert und dadurch eine Repression stabilisiert werden.

Abbildung 5.1 fasst dieses vorläufige Modell zusammen (siehe folgende Seite).

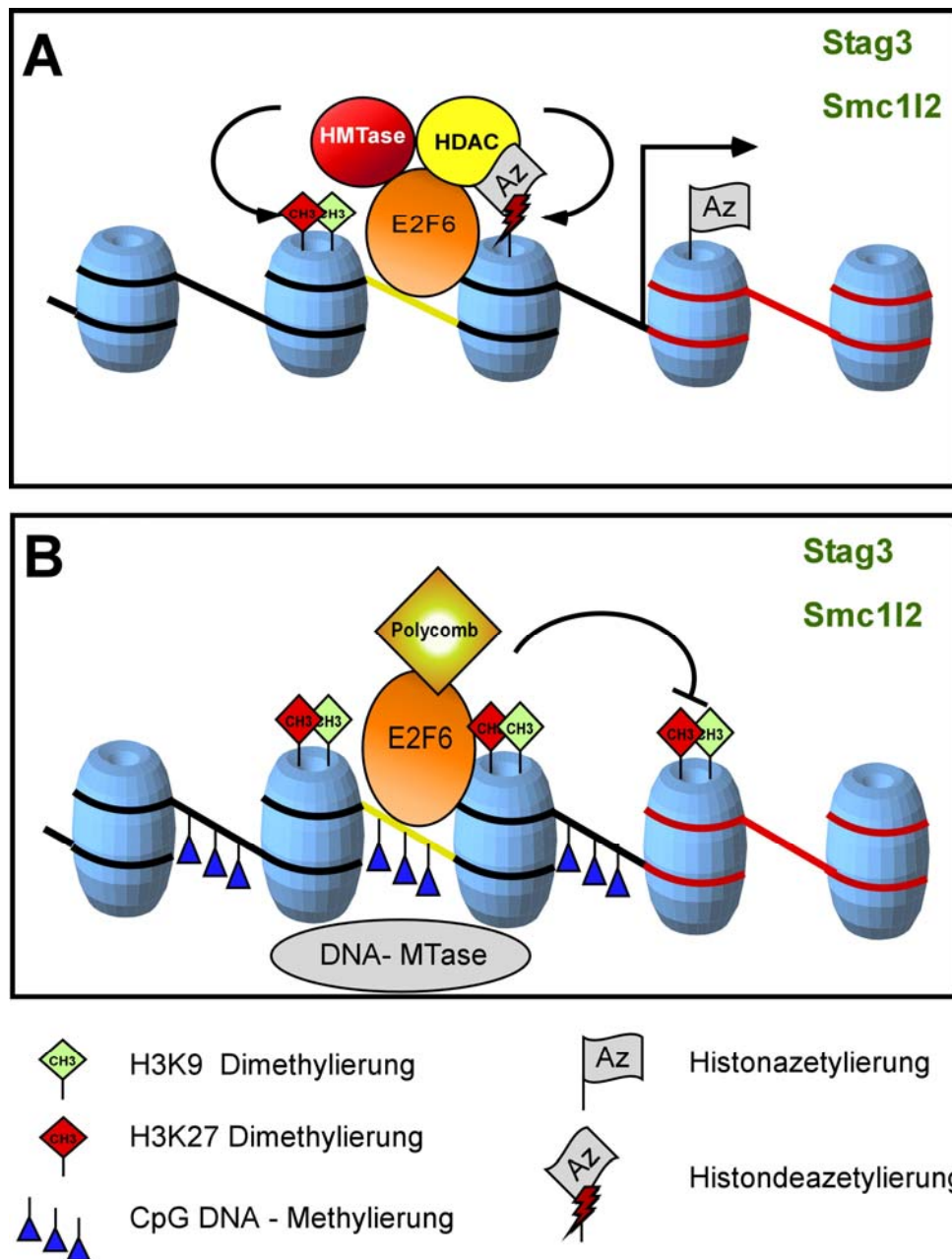


Abbildung 5.1: Modell zur E2F6 vermittelten Repression

E2F6 bindet an ein spezifisches E2F Konsenselement in den Promotoren von Stag3 und Smc112. Dadurch werden E2F6 assoziierte Chromatin-modifizierende Enzyme an die Promotoren rekrutiert. Zunächst erfolgt eine Deacetylierung spezifischer Histone durch die Aktivität von Histondeacetylasen (HDAC). Nachfolgend werden durch Histonmethyltransferasen (HMTasen) Histon H3 Lysin 9 (H3K9) dimethyliert (grün) und Histon H3 Lysin 27 (H3K27) trimethyliert (rot). Diese Modifikationen dienen als Bindestelle für Chromatin-assoziierte Proteine, wie z.B. Polycomb Proteinen (Polycomb), die eine dauerhafte und stabile Repression der Stag3 und Smc112 Expression vermitteln. In Ergänzung dazu scheint die stabile Repression von Stag3 und Smc112 durch die Methylierung von DNA, katalysiert durch DNA Methyltransferasen (DNA-MTase), stabilisiert zu werden.

6 Literaturverzeichnis

Akasaka, T., Kanno, M., Balling, R., Mieza, M., Taniguchi, M. and Koseki, H. (1996); A role for mel-18, a Polycomb group-related vertebrate gene, during the anterior-posterior specification of the axial skeleton. *Development* **122**(5), 1513-1522.

Akasaka, T., van Lohuizen, M., van der Lugt, N., Mizutani-Koseki, Y., Kanno, M., Taniguchi, M., Vidal, M., Alkema, M., Berns, A. and Koseki, H. (2001); Mice doubly deficient for the Polycomb Group genes *Mel18* and *Bmi1* reveal synergy and requirement for maintenance but not initiation of Hox gene expression. *Development* **128**(9), 1587-97.

Aslanian, A., Jaquinta, P. J., Verona, R. and Lees, J. A. (2004); Repression of the Arf tumor suppressor by E2F3 is required for normal cell cycle kinetics. *Genes Dev* **18**(12), 1413-22.

Ausubel, F. M., Brent, R.E. Kingstone, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith, K. Stuhl (1987); Current protocols in molecular biology. New York, **Greene Publishing Associates and Wiley-Intersciences.**

Ayyanathan, K., Lechner, M. S., Bell, P., Maul, G. G., Schultz, D. C., Yamada, Y., Tanaka, K., Torigoe, K. and Rauscher, F. J., 3rd (2003); Regulated recruitment of HP1 to a euchromatic gene induces mitotically heritable, epigenetic gene silencing: a mammalian cell culture model of gene variegation. *Genes Dev* **17**(15), 1855-69.

Bandara, L. R. and La Thangue, N. B. (1991); Adenovirus E1a prevents the retinoblastoma gene product from complexing with a cellular transcription factor. *Nature* **351**(6326), 494-7.

Bandara, L. R., Buck, V. M., Zamanian, M., Johnston, L. H. and La-Thangue, N. B. (1993); Functional synergy between DP-1 and E2F-1 in the cell cycle-regulating transcription factor DRTF1/E2F. *EMBO J.* **12**, 4317-4324.

Bannister, A. J., Zegerman, P., Partridge, J. F., Miska, E. A., Thomas, J. O., Allshire, R. C. and Kouzarides, T. (2001); Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain. *Nature* **410**(6824), 120-4.

Bartek, J., Bartkova, J. and Lukas, J. (1996); The retinoblastoma protein pathway and the restriction point. *Curr Opin Cell Biol* **8**(6), 805-14.

Bates, S., Phillips, A. C., Clark, P. A., Stott, F., Peters, G., Ludwig, R. L. and Vousden, K. H. (1998); p14ARF links the tumour suppressors RB and p53 [letter]. *Nature* **395** (6698), 124-5.

Bateson (1984); Materials for the study of Variation. London, **Macmillan.**

Beijersbergen, R. L., Kerkhoven, R. M., Zhu, L., Carlee, L., Voorhoeve, P. M. and Bernards, R. (1994); E2F-4, a new member of the E2F gene family, has oncogenic activity and associates with p107 in vivo. *Genes & Dev.* **15**, 2680-2690.

- Bel, S.,Core, N.,Djabali, M.,Kieboom, K.,Van der Lugt, N.,Alkema, M. J. and Van Lohuizen, M.** (1998); Genetic interactions and dosage effects of Polycomb group genes in mice. *Development* **125**(18), 3543-51.
- Bishop, C. E.,Boursot, P.,Baron, B.,Bonhomme, F. and Hatat, D.** (1985); Most classical *Mus musculus domesticus* laboratory mouse strains carry a *Mus musculus musculus* Y chromosome. *Nature* **315**(6014), 70-2.
- Brehm, A.,Miska, E. A.,McCance, D. J.,Reid, J. L.,Bannister, A. J. and Kouzarides, T.** (1998); Retinoblastoma protein recruits histone deacetylase to repress transcription [see comments]. *Nature* **391**(6667), 597-601.
- Brown, J. L.,Mucci, D.,Whiteley, M.,Dirksen, M. L. and Kassis, J. A.** (1998); The *Drosophila* Polycomb group gene pleiohomeotic encodes a DNA binding protein with homology to the transcription factor YY1. *Mol Cell* **1**(7), 1057-64.
- Buchkovich, K.,Duffy, L. A. and Harlow, E.** (1989); The retinoblastoma protein is phosphorylated during specific phases of the cell cycle. *Cell* **58**(6), 1097-105.
- Buonomo, S. B.,Clyne, R. K.,Fuchs, J.,Loidl, J.,Uhlmann, F. and Nasmyth, K.** (2000); Disjunction of homologous chromosomes in meiosis I depends on proteolytic cleavage of the meiotic cohesin Rec8 by separin. *Cell* **103**(3), 387-98.
- Burke, A. C.,Nelson, C. E.,Morgan, B. A. and Tabin, C.** (1995); Hox genes and the evolution of vertebrate axial morphology. *Development* **121**(2), 333-46.
- Cao, R.,Wang, L.,Wang, H.,Xia, L.,Erdjument-Bromage, H.,Tempst, P.,Jones, R. S. and Zhang, Y.** (2002); Role of histone H3 lysine 27 methylation in Polycomb-group silencing. *Science* **298**(5595), 1039-43.
- Cao, R. and Zhang, Y.** (2004); The functions of E(Z)/EZH2-mediated methylation of lysine 27 in histone H3. *Curr Opin Genet Dev* **14**(2), 155-64.
- Cartwright, P.,Muller, H.,Wagener, C.,Holm, K. and Helin, K.** (1998); E2F-6: a novel member of the E2F family is an inhibitor of E2F- dependent transcription. *Oncogene* **17**(5), 611-23.
- Chellappan, S. P.,Hiebert, S.,Mudryj, M.,Horowitz, J. M. and Nevins, J. R.** (1991); The E2F transcription factor is a cellular target for the RB protein. *Cell* **65**(6), 1053-1061.
- Chen, P. L.,Scully, P.,Shew, J. Y.,Wang, J. Y. and Lee, W. H.** (1989); Phosphorylation of the retinoblastoma gene product is modulated during the cell cycle and cellular differentiation. *Cell* **58**(6), 1193-8.
- Cillo, C.,Cantile, M.,Faiella, A. and Boncinelli, E.** (2001); Homeobox genes in normal and malignant cells. *J Cell Physiol* **188**(2), 161-9.
- Cloud, J. E.,Rogers, C.,Reza, T. L.,Ziebold, U.,Stone, J. R.,Picard, M. H.,Caron, A. M.,Bronson, R. T. and Lees, J. A.** (2002); Mutant mouse models reveal the relative roles of E2F1 and E2F3 in vivo. *Mol Cell Biol* **22**(8), 2663-72.

- Core, N., Bel, S., Gaunt, S. J., Aurrand-Lions, M., Pearce, J., Fisher, A. and Djabali, M.** (1997); Altered cellular proliferation and mesoderm patterning in Polycomb-M33-deficient mice. *Development* **124**(3), 721-9.
- Czermin, B., Melfi, R., McCabe, D., Seitz, V., Imhof, A. and Pirrotta, V.** (2002); Drosophila enhancer of Zeste/ESC complexes have a histone H3 methyltransferase activity that marks chromosomal Polycomb sites. *Cell* **111**(2), 185-96.
- Dahiya, A., Wong, S., Gonzalo, S., Gavin, M. and Dean, D. C.** (2001); Linking the Rb and polycomb pathways. *Mol Cell* **8**(3), 557-69.
- Dahme, T., Wood, J., Livingston, D. M. and Gaubatz, S.** (2002); Two different E2F6 proteins generated by alternative splicing and internal translation initiation. *Eur J Biochem* **269**(20), 5030-6.
- de Bruin, A., Maiti, B., Jakoi, L., Timmers, C., Buerki, R. and Leone, G.** (2003); Identification and characterization of E2F7, a novel mammalian E2F family member capable of blocking cellular proliferation. *J Biol Chem* **278**(43), 42041-9.
- DeCaprio, J. A., Ludlow, J. W., Figge, J., Shew, J. Y., Huang, C. M., Lee, W. H., Marsilio, E., Paucha, E. and Livingston, D. M.** (1988); SV40 large tumor antigen forms a specific complex with the product of the retinoblastoma susceptibility gene. *Cell* **54**(2), 275-83.
- DeCaprio, J. A., Furukawa, Y., Ajchenbaum, F., Griffin, J. D. and Livingston, D. M.** (1992); The retinoblastoma-susceptibility gene product becomes phosphorylated in multiple stages during cell cycle entry and progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(5), 1795-8.
- DeGregori, J., Leone, G., Ohtani, K., Miron, A. and Nevins, J. R.** (1995); E2F-1 accumulation bypasses a G1 arrest resulting from the inhibition of G1 cyclin-dependent kinase activity. *Genes & Dev.* **9**, 2873-2887.
- DeGregori, J., Leone, G., Miron, A., Jakoi, L. and Nevins, J. R.** (1997); Distinct roles for E2F proteins in cell growth control and apoptosis. *P.N.A.S.* **94**, 7245-7250.
- DeGregori, J.** (2002); The genetics of the E2F family of transcription factors: shared functions and unique roles. *Biochim Biophys Acta* **1602**(2), 131-50.
- del Mar Lorente, M., Marcos-Gutierrez, C., Perez, C., Schoorlemmer, J., Ramirez, A., Magin, T. and Vidal, M.** (2000); Loss- and gain-of-function mutations show a polycomb group function for Ring1A in mice. *Development* **127**(23), 5093-5100.
- Dellino, G. I., Schwartz, Y. B., Farkas, G., McCabe, D., Elgin, S. C. and Pirrotta, V.** (2004); Polycomb silencing blocks transcription initiation. *Mol Cell* **13**(6), 887-93.
- DeRisi, J. L., Iyer, V. R. and Brown, P. O.** (1997); Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. *Science* **278**(5338), 680-6.

Di Stefano, L., Jensen, M. R. and Helin, K. (2003); E2F7, a novel E2F featuring DP-independent repression of a subset of E2F-regulated genes. *Embo J* **22**(23), 6289-98.

Dunaief, J. L., Strober, B. E., Guha, S., Khavari, P. A., Alin, K., Luban, J., Begemann, M., Crabtree, G. R. and Goff, S. P. (1994); The retinoblastoma protein and BRG1 form a complex and cooperate to induce cell cycle arrest. *Cell* **79**(1), 119-30.

Dyson, N., Howley, P. M., Munger, K. and Harlow, E. (1989); The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science* **243**(4893), 934-7.

Dyson, N., Dembski, M., Fattaey, A., Ngwu, C., Ewen, M. and Helin, K. (1993); Analysis of p107-associated proteins: p107 associates with a form of E2F that differs from pRB-associated E2F-1. *J. Virol.* **67**, 7641-7647.

Dyson, N. (1998); The regulation of E2F by pRB-family proteins. *Genes & Dev.* **12**, 2245-2262.

Eijpe, M., Offenberg, H., Jessberger, R., Revenkova, E. and Heyting, C. (2003); Meiotic cohesin REC8 marks the axial elements of rat synaptonemal complexes before cohesins SMC1beta and SMC3. *J Cell Biol* **160**(5), 657-70.

Ferreira, R., Magnaghi, J. L., Robin, P., Harel, B. A. and Trouche, D. (1998); The three members of the pocket proteins family share the ability to repress E2F activity through recruitment of a histone deacetylase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(18), 10493-8.

Ferreira, R., Naguibneva, I., Mathieu, M., Ait-Si-Ali, S., Robin, P., Pritchard, L. L. and Harel-Bellan, A. (2001); Cell cycle-dependent recruitment of HDAC-1 correlates with deacetylation of histone H4 on an Rb-E2F target promoter. *EMBO Rep* **2**(9), 794-9.

Festing (1889); Inbred Strains of mice, **Oxford University Press, England.**

Field, S. J., Tsai, F.-Y., Kuo, F., Zubiaga, A. M., Kaelin, W. G., Livingston, M. D., Orkin, S. H. and Greenberg, M. E. (1996); E2F-1 functions in mice to promote apoptosis and suppress proliferation. *Cell* **85**, 549-561.

Flemington, E. K., Speck, S. H. and Kaelin, W. G. (1993); E2F-1 mediated transactivation is inhibited by complex formation with the retinoblastoma susceptibility gene product. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 6914-6918.

Frolov, M. V. and Dyson, N. J. (2004); Molecular mechanisms of E2F-dependent activation and pRB-mediated repression. *J Cell Sci* **117**(Pt 11), 2173-81.

Fuks, F., Burgers, W. A., Brehm, A., Hughes-Davies, L. and Kouzarides, T. (2000); DNA methyltransferase Dnmt1 associates with histone deacetylase activity. *Nat Genet* **24**(1), 88-91.

Fuks, F., Burgers, W. A., Godin, N., Kasai, M. and Kouzarides, T. (2001); Dnmt3a binds deacetylases and is recruited by a sequence-specific repressor to silence transcription. *Embo J* **20**(10), 2536-44.

- Fuks, F., Hurd, P. J., Deplus, R. and Kouzarides, T.** (2003); The DNA methyltransferases associate with HP1 and the SUV39H1 histone methyltransferase. *Nucleic Acids Res* **31**(9), 2305-12.
- Garcia, E., Marcos-Gutierrez, C., del Mar Lorente, M., Moreno, J. C. and Vidal, M.** (1999); RYBP, a new repressor protein that interacts with components of the mammalian Polycomb complex, and with the transcription factor YY1. *Embo J* **18**(12), 3404-18.
- Gaubatz, S., Wood, J. G. and Livingston, D. M.** (1998); Unusual proliferation arrest and transcriptional control properties of a newly discovered E2F family member, E2F-6. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 9190-5.
- Gaubatz, S., Lindeman, G. J., Ishida, S., Jakoi, L., Nevins, J. R., Livingston, D. M. and Rempel, R. E.** (2000); E2F4 and E2F5 play an essential role in pocket protein-mediated G1 control. *Mol Cell* **6**(3), 729-35.
- Gaubatz, S., Lees, J. A., Lindeman, G. J. and Livingston, D. M.** (2001); E2F4 is exported from the nucleus in a CRM1-dependent manner. *Mol Cell Biol* **21**(4), 1384-92.
- Ghosh, M. K. and Harter, M. L.** (2003); A viral mechanism for remodeling chromatin structure in G0 cells. *Mol Cell* **12**(1), 255-60.
- Gil, J., Bernard, D., Martinez, D. and Beach, D.** (2004); Polycomb CBX7 has a unifying role in cellular lifespan. *Nat Cell Biol* **6**(1), 67-72.
- Girling, R., Partridge, J. F., Bandara, L. R., Burden, N., Totty, N. F., Hsuan, J. J. and La Thangue, N. B.** (1993); A new component of the transcription factor DRTF1/E2F1. *Nature* **362**, 83-87.
- Graham, A., Papalopulu, N. and Krumlauf, R.** (1989); The murine and Drosophila homeobox gene complexes have common features of organization and expression. *Cell* **57**(3), 367-78.
- Gruss, P. and Kessel, M.** (1991); Axial specification in higher vertebrates. *Curr Opin Genet Dev* **1**(2), 204-10.
- Hanahan, D.** (1983); Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *J Mol Biol* **166**(4), 557-80.
- Harbour, J. W., Luo, R. X., Dei Santi, A., Postigo, A. A. and Dean, D. C.** (1999); Cdk phosphorylation triggers sequential intramolecular interactions that progressively block Rb functions as cells move through G1. *Cell* **98**(6), 859-69.
- Harte, P. J., Wu, W., Carrasquillo, M. M. and Matera, A. G.** (1999); Assignment of a novel bifurcated SET domain gene, SETDB1, to human chromosome band 1q21 by in situ hybridization and radiation hybrids. *Cytogenet Cell Genet* **84**(1-2), 83-6.
- Hassig, C. A., Tong, J. K., Fleischer, T. C., Owa, T., Grable, P. G., Ayer, D. E. and Schreiber, S. L.** (1998); A role for histone deacetylase activity in HDAC1-mediated transcriptional repression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(7), 3519-24.

- Helin, K., Lees, J. A., Vidal, M., Dyson, N., Harlow, E. and Fattaey, A.** (1992); A cDNA encoding a pRb-binding protein with properties of the transcription factor E2F. *Cell* **70**, 337-350.
- Helin, K., Harlow, E. and Fattaey, A.** (1993); Inhibition of E2F-1 transactivation by direct binding of the retinoblastoma protein. *Mol. Cell. Biol.* **13**, 6501-6508.
- Helin, K., Wu, C. L., Fattaey, A. R., Lees, J. A., Dyntlacht, B. D., Ngwu, C. and Harlow, E.** (1993); Heterodimerization of the transcription factors E2F-1 and DP-1 leads to cooperative trans-activation. *Genes & Dev.* **7**, 1850-1861.
- Heller, R. A., Schena, M., Chai, A., Shalon, D., Bedilion, T., Gilmore, J., Woolley, D. E. and Davis, R. W.** (1997); Discovery and analysis of inflammatory disease-related genes using cDNA microarrays. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(6), 2150-5.
- Hiebert, S. W., Packham, G., Strom, D. K., Haffner, R., Oren, M., Zambetti, G. and Cleveland, J. L.** (1995); E2F-1:DP-1 induces p53 and overrides survival factors to trigger apoptosis. *Mol Cell Biol* **15**(12), 6864-74.
- Hijmans, E. M., Voorhoeve, P. M., Beijersbergen, R. L., van't Veer, L. J. and Bernards, R.** (1995); E2F-5, a new E2F family member that interacts with p130 in vivo. *Mol. Cell. Biol.* **15**(6), 3082-3089.
- Humbert, P. O., Verona, R., Trimarchi, J. M., Rogers, C., Dandapani, S. and Lees, J. A.** (2000); E2f3 is critical for normal cellular proliferation. *Genes Dev* **14**(6), 690-703.
- Humbert, P. O., Rogers, C., S., G., Landsberg, R. L. T., J.M., Dandapani, S., Brugnara, C., Erdman, S., Schrenzel, M., Bronson, R. T. and Lees, J. A.** (2000); E2F4 is essential for normal erythrocyte maturation and neonatal viability. *Mol. Cell* **6**, 281-291.
- Hurlin, P. J., Steingrimsson, E., Copeland, N. G., Jenkins, N. A. and Eisenman, R. N.** (1999); Mga, a dual-specificity transcription factor that interacts with Max and contains a T-domain DNA-binding motif. *Embo J* **18**(24), 7019-28.
- Ikeda, M. A., Jakoi, L. and Nevins, J. R.** (1996); A unique role for the Rb protein in controlling E2F accumulation during cell growth and differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(8), 3215-20.
- Ishida, S., Huang, E., Zuzan, H., Spang, R., Leone, G., West, M. and Nevins, J. R.** (2001); Role for E2F in control of both DNA replication and mitotic functions as revealed from DNA microarray analysis. *Mol Cell Biol* **21**(14), 4684-99.
- Ivey-Holey, M., Conroy, R., Huber, H., Goodhart, P. J., Olif, A. and Heimbrook, D. C.** (1993); Cloning and characterization of E2F-2, a novel protein with the biochemical properties of transcription factor E2F. *Mol. Cell. Biol.* **13**, 7802-7812.
- Jacobs, J. J., Kieboom, K., Marino, S., DePinho, R. A. and van Lohuizen, M.** (1999); The oncogene and Polycomb-group gene bmi-1 regulates cell proliferation and senescence through the ink4a locus. *Nature* **397**(6715), 164-8.

- Jacobs, J. J., Scheijen, B., Voncken, J. W., Kieboom, K., Berns, A. and van Lohuizen, M.** (1999); Bmi-1 collaborates with c-Myc in tumorigenesis by inhibiting c-Myc- induced apoptosis via INK4a/ARF. *Genes Dev* **13**(20), 2678-90.
- Jacobs, J. J. and van Lohuizen, M.** (2002); Polycomb repression: from cellular memory to cellular proliferation and cancer. *Biochim Biophys Acta* **1602**(2), 151-61.
- Jaenisch, R. and Bird, A.** (2003); Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat Genet* **33 Suppl**, 245-54.
- Johnson, D. G., Schwarz, J. K., Douglas Crees, W. and Nevins, J. R.** (1993); Expression of transcription factor E2F1 induces quiescent cells to enter S phase. *Nature* **365**, 349-352.
- Jones, P. L., Veenstra, G. J., Wade, P. A., Vermaak, D., Kass, S. U., Landsberger, N., Strouboulis, J. and Wolffe, A. P.** (1998); Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nat Genet* **19**(2), 187-91.
- Kaelin, W. G., Jr., Pallas, D. C., DeCaprio, J. A., Kaye, F. J. and Livingston, D. M.** (1991); Identification of cellular proteins that can interact specifically with the T/E1A-binding region of the retinoblastoma gene product. *Cell* **64**(3), 521-32.
- Kaelin, W. G., Krek, W., Sellers, W. R., DeCaprio, J. A., Ajchenbaum, F., Fuchs, C. S., Chittenden, T., Li, Y., Farnham, P. J., Blanas, M. A., Livingston, D. M. and Flemington, E. K.** (1992); Expression cloning of a cDNA encoding a retinoblastoma-binding protein with E2F-like properties. *Cell* **70**, 351-364.
- Kanno, M., Hasegawa, M., Ishida, A., Isono, K. and Taniguchi, M.** (1995); mel-18, a Polycomb group-related mammalian gene, encodes a transcriptional negative regulator with tumor suppressive activity. *Embo J* **14**(22), 5672-8.
- Kessel, M. and Gruss, P.** (1990); Murine developmental control genes. *Science* **249**(4967), 374-9.
- Kessel, M. and Gruss, P.** (1991); Homeotic transformations of murine vertebrae and concomitant alteration of Hox codes induced by retinoic acid. *Cell* **67**(1), 89-104.
- Kherrouche, Z., Begue, A., Stehelin, D. and Monte, D.** (2001); Molecular cloning and characterization of the mouse E2F6 gene. *Biochem Biophys Res Commun* **288**(1), 22-33.
- Kirmizis, A., Bartley, S. M., Kuzmichev, A., Margueron, R., Reinberg, D., Green, R. and Farnham, P. J.** (2004); Silencing of human polycomb target genes is associated with methylation of histone H3 Lys 27. *Genes Dev.* **18**(13), 1592-1605.
- Kispert, A. and Hermann, B. G.** (1993); The Brachyury gene encodes a novel DNA binding protein. *Embo J* **12**(12), 4898-9.
- Klein, F., Mahr, P., Galova, M., Buonomo, S. B., Michaelis, C., Nairz, K. and Nasmyth, K.** (1999); A central role for cohesins in sister chromatid cohesion, formation of axial elements, and recombination during yeast meiosis. *Cell* **98**(1), 91-103.

- Kouzarides, T.** (1999); Histone acetylases and deacetylases in cell proliferation. *Curr Opin Genet Dev* **9**(1), 40-8.
- Kovesdi, I., Reichel, R. and Nevins, J. R.** (1986); Identification of a cellular transcription factor involved in E1A trans-activation. *Cell* **45**(2), 219-28.
- Kuzmichev, A., Nishioka, K., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. and Reinberg, D.** (2002); Histone methyltransferase activity associated with a human multiprotein complex containing the Enhancer of Zeste protein. *Genes Dev* **16**(22), 2893-905.
- Kuzmichev, A., Jenuwein, T., Tempst, P. and Reinberg, D.** (2004); Different EZH2-containing complexes target methylation of histone H1 or nucleosomal histone H3. *Mol Cell* **14**(2), 183-93.
- La Thangue, N. B. and Rigby, P. W.** (1987); An adenovirus E1A-like transcription factor is regulated during the differentiation of murine embryonal carcinoma stem cells. *Cell* **49**(4), 507-13.
- La Thangue, N. B.** (2002); Transcription. Chromatin control--a place for E2F and Myc to meet. *Science* **296**(5570), 1034-5.
- Lachner, M., O'Carroll, D., Rea, S., Mechtler, K. and Jenuwein, T.** (2001); Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins. *Nature* **410**(6824), 116-20.
- Lachner, M., O'Sullivan, R. J. and Jenuwein, T.** (2003); An epigenetic road map for histone lysine methylation. *J Cell Sci* **116**(Pt 11), 2117-24.
- Laemmli, U. K.** (1970); Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**(259), 680-5.
- Lee, W. H., Bookstein, R., Hong, F., Young, L. J., Shew, J. Y. and Lee, E. Y.** (1987); Human retinoblastoma susceptibility gene: cloning, identification, and sequence. *Science* **235**(4794), 1394-9.
- Lee, J., Yokota, T. and Yamashita, M.** (2002); Analyses of mRNA expression patterns of cohesin subunits Rad21 and Rec8 in mice: germ cell-specific expression of rec8 mRNA in both male and female mice. *Zool Sci* **19**(5), 539-44.
- Lees, J., Buchkovich, K., Marshak, D., Anderson, C. and Harlow, E.** (1991); The retinoblastoma protein is phosphorylated on multiple sites by human cdc2. *EMBO J.* **10**(13), 4279-4290.
- Lees, J. A., Saito, M., Vidal, M., Valentine, M., Look, T., Harlow, E., Dyson, N. and Helin, K.** (1993); The retinoblastoma protein binds to a family of E2F transcription factors. *Mol. Cell. Biol.* **13**, 7813-7825.
- Leone, G., DeGregori, J., Yan, Z., Jakoi, L., Ishida, S., Williams, R. S. and Nevins, J. R.** (1998); E2F3 activity is regulated during the cell cycle and is required for the induction of S phase. *Genes Dev* **12**(14), 2120-30.

- Levine, S. S., Weiss, A., Erdjument-Bromage, H., Shao, Z., Tempst, P. and Kingston, R. E.** (2002); The Core of the Polycomb Repressive Complex Is Compositionally and Functionally Conserved in Flies and Humans. *Mol. Cell. Biol.* **22**(17), 6070-6078.
- Lin, B., Gruenwald, S., Morla, A., Lee, W. and Wang, J.** (1991); Retinoblastoma cancer suppressor gene product is a substrate of the cell cycle regulator cdc2 kinase. *EMBO J.* **10**(4), 857-864.
- Lindeman, G. J., Dagnino, L., Gaubatz, S., Xu, Y., Bronson, R. T., Warren, H. B. and Livingston, D. M.** (1998); A specific, nonproliferative role for E2F-5 in choroid plexus function revealed by gene targeting. *Genes Dev* **12**(8), 1092-8.
- Logan, N., Delavaine, L., Graham, A., Reilly, C., Wilson, J., Brummelkamp, T. R., Hijmans, E. M., Bernardis, R. and La Thangue, N. B.** (2004); E2F-7: a distinctive E2F family member with an unusual organization of DNA-binding domains. *Oncogene* **23**(30), 5138-50.
- Ludlow, J. W., DeCaprio, J. A., Huang, C. M., Lee, W. H., Paucha, E. and Livingston, D. M.** (1989); SV40 large T antigen binds preferentially to an underphosphorylated member of the retinoblastoma susceptibility gene product family. *Cell* **56**(1), 57-65.
- Ludlow, J. W., Shon, J., Pipas, J. M., Livingston, D. M. and DeCaprio, J. A.** (1990); The retinoblastoma susceptibility gene product undergoes cell cycle-dependent dephosphorylation and binding to and release from SV40 large T. *Cell* **60**(3), 387-96.
- Lukas, J., Petersen, B. O., Holm, K., Bartek, J. and Helin, K.** (1996); Deregulated expression of E2F family members induces S-phase entry and overcomes p16INK4A-mediated growth suppression. *Mol Cell Biol* **16**(3), 1047-57.
- Luo, R. X., Postigo, A. A. and Dean, D. C.** (1998); Rb interacts with histone deacetylase to repress transcription. *Cell* **92**(4), 463-73.
- Magae, J., Wu, C. L., Illenye, S., Harlow, E. and Heintz, N. H.** (1996); Nuclear localization of DP and E2F transcription factors by heterodimeric partners and retinoblastoma protein family members. *J. Cell Sci.* **109**(Part 7), 1717-1726.
- Magnaghi, J. L., Groisman, R., Naguibneva, I., Robin, P., Lorain, S., Le, V. J., Troalen, F., Trouche, D. and Harel, B. A.** (1998); Retinoblastoma protein represses transcription by recruiting a histone deacetylase [see comments]. *Nature* **391**(6667), 601-5.
- Mann, D. J. and Jones, N. C.** (1996); E2F-1 but not E2F-4 can overcome p16-induced G1 cell-cycle arrest. *Curr Biol* **6**(4), 474-83.
- Martinez-Balbas, M. A., Bauer, U.-M., Nielsen, S. J., Brehm, A. and Kouzarides, T.** (2000); Regulation of E2F1 activity by acetylation. *EMBO J.* **19**(4), 662-671.
- Marzio, G., Wagener, C., Gutierrez, M. I., Cartwright, P., Helin, K. and Giacca, M.** (2000); E2F family members are differentially regulated by reversible acetylation. *J Biol Chem* **275**(15), 10887-92.

- Moberg, K., Starz, M. A. and Lees, J. A.** (1996); E2F-4 switches from p130 to p107 and pRB in response to cell cycle reentry. *Mol. Cell. Biol.* **16**(4), 1436-1449.
- Mohd-Sarip, A., Venturini, F., Chalkley, G. E. and Verrijzer, C. P.** (2002); Pleiohomeotic Can Link Polycomb to DNA and Mediate Transcriptional Repression. *Mol. Cell. Biol.* **22**(21), 7473-7483.
- Molnar, M., Bahler, J., Sipiczki, M. and Kohli, J.** (1995); The *rec8* gene of *Schizosaccharomyces pombe* is involved in linear element formation, chromosome pairing and sister-chromatid cohesion during meiosis. *Genetics* **141**(1), 61-73.
- Morgenstern, J. P. and Land, H.** (1990); Advanced mammalian gene transfer: high titre retroviral vectors with multiple drug selection markers and a complementary helper-free packaging cell line. *Nucleic Acids Res* **18**(12), 3587-96.
- Morkel, M., Wenkel, J., Bannister, A., J., Kouzarides, T. and Hagemeyer, C.** (1997); An E2F-like repressor of transcription. *Nature* **390**, 567-568.
- Morris, L., Allen, K. E. and La Thangue, N. B.** (2000); Regulation of E2F transcription by cyclin E-Cdk2 kinase mediated through p300/CBP co-activators. *Nat Cell Biol* **2**(4), 232-9.
- Mueller, H., Moroni, M. C., Vigo, E., Petersen, B. O., Bartek, J. and Helin, K.** (1997); Induction of S-phase entry by E2F transcription factors depends on their nuclear localization. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 5508-5520.
- Muller, C. W. and Herrmann, B. G.** (1997); Crystallographic structure of the T domain-DNA complex of the Brachyury transcription factor. *Nature* **389**(6653), 884-8.
- Muller, H. and Helin, K.** (2000); The E2F transcription factors: key regulators of cell proliferation. *Biochim Biophys Acta* **1470**(1), M1-12.
- Muller, H., Bracken, A. P., Vernell, R., Moroni, M. C., Christians, F., Grassilli, E., Prosperini, E., Vigo, E., Oliner, J. D. and Helin, K.** (2001); E2Fs regulate the expression of genes involved in differentiation, development, proliferation, and apoptosis. *Genes Dev* **15**(3), 267-85.
- Muller, J., Hart, C. M., Francis, N. J., Vargas, M. L., Sengupta, A., Wild, B., Miller, E. L., O'Connor, M. B., Kingston, R. E. and Simon, J. A.** (2002); Histone methyltransferase activity of a *Drosophila* Polycomb group repressor complex. *Cell* **111**(2), 197-208.
- Murga, M., Fernandez-Capetillo, O., Field, S. J., Moreno, B., Borlado, L. R., Fujiwara, Y., Balomenos, D., Vicario, A., Carrera, A. C., Orkin, S. H., Greenberg, M. E. and Zubiaga, A. M.** (2001); Mutation of E2F2 in mice causes enhanced T lymphocyte proliferation, leading to the development of autoimmunity. *Immunity* **15**(6), 959-70.
- Murray, A. W.** (1992); Creative blocks: cell-cycle checkpoints and feedback controls. *Nature* **359**(6396), 599-604.

- Nakayama, J.-i., Rice, J. C., Strahl, B. D., Allis, C. D. and Grewal, S. I. S.** (2001); Role of Histone H3 Lysine 9 Methylation in Epigenetic Control of Heterochromatin Assembly. *Science* **292**(5514), 110-113.
- Nan, X., Ng, H. H., Johnson, C. A., Laherty, C. D., Turner, B. M., Eisenman, R. N. and Bird, A.** (1998); Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature* **393**(6683), 386-9.
- Narlikar, G. J., Fan, H. Y. and Kingston, R. E.** (2002); Cooperation between complexes that regulate chromatin structure and transcription. *Cell* **108**(4), 475-87.
- Ng, H. H. and Bird, A.** (1999); DNA methylation and chromatin modification. *Curr Opin Genet Dev* **9**(2), 158-63.
- Nicolas, E., Roumillac, C. and Trouche, D.** (2003); Balance between acetylation and methylation of histone H3 lysine 9 on the E2F-responsive dihydrofolate reductase promoter. *Mol Cell Biol* **23**(5), 1614-22.
- Nielsen, S. J., Schneider, R., Bauer, U. M., Bannister, A. J., Morrison, A., O'Carroll, D., Firestein, R., Cleary, M., Jenuwein, T., Herrera, R. E. and Kouzarides, T.** (2001); Rb targets histone H3 methylation and HP1 to promoters. *Nature* **412**(6846), 561-5.
- Noma, K., Allis, C. D. and Grewal, S. I.** (2001); Transitions in distinct histone H3 methylation patterns at the heterochromatin domain boundaries. *Science* **293**(5532), 1150-5.
- Nurse, P.** (1990); Universal control mechanism regulating onset of M-phase. *Nature* **344**(6266), 503-8.
- Oberley, M. J., Inman, D. R. and Farnham, P. J.** (2003); E2F6 negatively regulates BRCA1 in human cancer cells without methylation of histone H3 on lysine 9. *J Biol Chem* **278**(43), 42466-76.
- Ogawa, H., Ishiguro, K., Gaubatz, S., Livingston, D. M. and Nakatani, Y.** (2002); A complex with chromatin modifiers that occupies E2F- and Myc-responsive genes in G0 cells. *Science* **296**, 1132-1136.
- Papaioannou, V. E. and Silver, L. M.** (1998); The T-box gene family. *Bioessays* **20**(1), 9-19.
- Peters, A. H., Kubicek, S., Mechtler, K., O'Sullivan, R. J., Derijck, A. A., Perez-Burgos, L., Kohlmaier, A., Opravil, S., Tachibana, M., Shinkai, Y., Martens, J. H. and Jenuwein, T.** (2003); Partitioning and plasticity of repressive histone methylation states in mammalian chromatin. *Mol Cell* **12**(6), 1577-89.
- Petronczki, M., Siomos, M. F. and Nasmyth, K.** (2003); Un menage a quatre: the molecular biology of chromosome segregation in meiosis. *Cell* **112**(4), 423-40.

- Pezzi, N., Prieto, I., Kremer, L., Perez Jurado, L. A., Valero, C., Del Mazo, J., Martinez, A. C. and Barbero, J. L.** (2000); STAG3, a novel gene encoding a protein involved in meiotic chromosome pairing and location of STAG3-related genes flanking the Williams-Beuren syndrome deletion. *Faseb J* **14**(3), 581-92.
- Prieto, I., Suja, J. A., Pezzi, N., Kremer, L., Martinez, A. C., Rufas, J. S. and Barbero, J. L.** (2001); Mammalian STAG3 is a cohesin specific to sister chromatid arms in meiosis I. *Nat Cell Biol* **3**(8), 761-6.
- Qin, X. Q., Livingston, D. M., Kaelin, W. G., Jr. and Adams, P. D.** (1994); Deregulated transcription factor E2F-1 expression leads to S-phase entry and p53-mediated apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(23), 10918-22.
- Rempel, R. E., M.T., S.-R., Storms, R., Morham, S., Ishida, S., Engel, A., L., J., Melhem, M. F., Pipas, J. M., Smith, C. and Nevins, J. R.** (2000); Loss of E2F4 activity leads to abnormal development of multiple lineages. *Mol. Cell* **6**, 293-306.
- Ren, B., Cam, H., Takahashi, Y., Volkert, T., Terragni, J., Young, R. A. and Dynlacht, B. D.** (2002); E2F integrates cell cycle progression with DNA repair, replication, and G(2)/M checkpoints. *Genes Dev* **16**(2), 245-56.
- Revenkova, E., Eijpe, M., Heyting, C., Gross, B. and Jessberger, R.** (2001); Novel meiosis-specific isoform of mammalian SMC1. *Mol Cell Biol* **21**(20), 6984-98.
- Robertson, K. D., Ait-Si-Ali, S., Yokochi, T., Wade, P. A., Jones, P. L. and Wolffe, A. P.** (2000); DNMT1 forms a complex with Rb, E2F1 and HDAC1 and represses transcription from E2F-responsive promoters. *Nat Genet* **25**(3), 338-42.
- Roopra, A., Qazi, R., Schoenike, B., Daley, T. J. and Morrison, J. F.** (2004); Localized domains of g9a-mediated histone methylation are required for silencing of neuronal genes. *Mol Cell* **14**(6), 727-38.
- Russell, L. D., Ettl, R. A., Sinahi Hikim, A. P. and Clegg, E. D.** (1990); Histological and Histopathological Evaluation of the testis. Clearwater, Florida, **Cache River Press**.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch, Z. Maniatis** (1989); Molecular Cloning: A laboratory manual. New York, **Cold Spring Harbor Laboratory Press**.
- Schlisio, S., Halperin, T., Vidal, M. and Nevins, J. R.** (2002); Interaction of YY1 with E2Fs, mediated by RYBP, provides a mechanism for specificity of E2F function. *Embo J* **21**(21), 5775-86.
- Schultz, D. C., Friedman, J. R. and Rauscher, F. J., 3rd** (2001); Targeting histone deacetylase complexes via KRAB-zinc finger proteins: the PHD and bromodomains of KAP-1 form a cooperative unit that recruits a novel isoform of the Mi-2alpha subunit of NuRD. *Genes Dev* **15**(4), 428-43.
- Schultz, D. C., Ayyanathan, K., Negorev, D., Maul, G. G. and Rauscher, F. J., III** (2002); SETDB1: a novel KAP-1-associated histone H3, lysine 9-specific methyltransferase that contributes to HP1-mediated silencing of euchromatic genes by KRAB zinc-finger proteins. *Genes Dev.* **16**(8), 919-932.

- Schumacher, A. and Magnuson, T.** (1997); Murine Polycomb- and trithorax-group genes regulate homeotic pathways and beyond. *Trends Genet* **13**(5), 167-70.
- Shan, B. and Lee, W. H.** (1994); Deregulated expression of E2F-1 induces S-phase entry and leads to apoptosis. *Mol Cell Biol* **14**(12), 8166-73 Issn: 0270-7306.
- Shao, Z., Raible, F., Mollaaghababa, R., Guyon, J. R., Wu, C. T., Bender, W. and Kingston, R. E.** (1999); Stabilization of chromatin structure by PRC1, a Polycomb complex. *Cell* **98**(1), 37-46.
- Sherr, C. J.** (1996); Cancer cell cycles. *Science* **274**(5293), 1672-7.
- Shi, Y., Sawada, J., Sui, G., Affar el, B., Whetstine, J. R., Lan, F., Ogawa, H., Luke, M. P. and Nakatani, Y.** (2003); Coordinated histone modifications mediated by a CtBP co-repressor complex. *Nature* **422**(6933), 735-8.
- Shirodkar, S.** (1992); The transcription factor E2F interacts with the retinoblastoma product and a p107-cyclin a complex in a cell cycle-regulated manner. *Cell* **68**, 157-166.
- Sterner, D. E. and Berger, S. L.** (2000); Acetylation of histones and transcription-related factors. *Microbiol Mol Biol Rev* **64**(2), 435-59.
- Storre, J., Elsaesser, H.-P., Fuchs, M., Ullmann, D., Livingston, D. M. and Gaubatz, S.** (2002); Homeotic transformations of the axial skeleton that accompany a targeted deletion of E2F6. *EMBO Rep* **3**(7), 695-700.
- Strahl, B. D. and Allis, C. D.** (2000); The language of covalent histone modifications. *Nature* **403**(6765), 41-5.
- Strober, B. E., Dunaief, J. L., Guha and Goff, S. P.** (1996); Functional interactions between the hBRM/hBRG1 transcriptional activators and the pRB family of proteins. *Mol Cell Biol* **16**(4), 1576-83.
- Tachibana, M., Sugimoto, K., Fukushima, T. and Shinkai, Y.** (2001); SET Domain-containing Protein, G9a, Is a Novel Lysine-preferring Mammalian Histone Methyltransferase with Hyperactivity and Specific Selectivity to Lysines 9 and 27 of Histone H3. *J. Biol. Chem.* **276**(27), 25309-25317.
- Tachibana, M., Sugimoto, K., Nozaki, M., Ueda, J., Ohta, T., Ohki, M., Fukuda, M., Takeda, N., Niida, H., Kato, H. and Shinkai, Y.** (2002); G9a histone methyltransferase plays a dominant role in euchromatic histone H3 lysine 9 methylation and is essential for early embryogenesis. *Genes Dev.* **16**(14), 1779-1791.
- Tajul-Arifin, K., Teasdale, R., Ravasi, T., Hume, D. A. and Mattick, J. S.** (2003); Identification and analysis of chromodomain-containing proteins encoded in the mouse transcriptome. *Genome Res* **13**(6B), 1416-29.
- Takahashi, Y., Rayman, J. B. and Dynlacht, B. D.** (2000); Analysis of promoter binding by the E2F and pRB families in vivo: distinct E2F proteins mediate activation and repression. *Genes Dev* **14**(7), 804-816.

- Takahara, Y., Tomotsune, D., Shirai, M., Katoh-Fukui, Y., Nishii, K., Motaleb, M. A., Nomura, M., Tsuchiya, R., Fujita, Y., Shibata, Y., Higashinakagawa, T. and Shimada, K. (1997);** Targeted disruption of the mouse homologue of the *Drosophila* polyhomeotic gene leads to altered anteroposterior patterning and neural crest defects. *Development* **124** (19), 3673-82.
- Taubert, S., Gorrini, C., Frank, S. R., Parisi, T., Fuchs, M., Chan, H. M., Livingston, D. M. and Amati, B. (2004);** E2F-dependent histone acetylation and recruitment of the Tip60 acetyltransferase complex to chromatin in late G1. *Mol Cell Biol* **24**(10), 4546-56.
- Trimarchi, J. M., Fairchild, B., Verona, R., Moberg, K., Andon, N. and Lees, J. A. (1998);** E2F-6, a member of the E2F family that can behave as transcriptional repressor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 2850-2855.
- Trimarchi, J. M., Fairchild, B., Wen, J. and Lees, J. A. (2001);** The E2F6 transcription factor is a component of the mammalian Bmi1- containing polycomb complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(4), 1519-24.
- Trimarchi, J. M. and Lees, J. A. (2002);** Sibling rivalry in the E2F family. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**(1), 11-20.
- Trouche, D. and Kouzarides, T. (1996);** E2F1 and E1A(12S) have a homologous activation domain regulated by RB and CBP. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(4), 1439-42.
- Vairo, G., Livingston, D. M. and Ginsberg, D. (1995);** Functional interaction between E2F-4 and p130: evidence for distinct mechanism underlying growth suppression by different retinoblastoma protein family members. *Genes & Dev.* **9**, 869-881.
- van der Lugt, N. M., Domen, J., Linders, K., van Roon, M., Robanus-Maandag, E., te Riele, H., van der Valk, M., Deschamps, J., Sofroniew, M., van Lohuizen, M. and et al. (1994);** Posterior transformation, neurological abnormalities, and severe hematopoietic defects in mice with a targeted deletion of the *bmi-1* proto-oncogene. *Genes Dev* **8**(7), 757-69.
- van der Lugt, N. M., Alkema, M., Berns, A. and Deschamps, J. (1996);** The Polycomb-group homolog *Bmi-1* is a regulator of murine *Hox* gene expression. *Mech Dev* **58**(1-2), 153-64.
- van der Vlag, J. and Otte, A. P. (1999);** Transcriptional repression mediated by the human polycomb-group protein EED involves histone deacetylation. *Nat Genet* **23**(4), 474-8.
- Vandel, L., Nicolas, E., Vaute, O., Ferreira, R., Ait-Si-Ali, S. and Trouche, D. (2001);** Transcriptional Repression by the Retinoblastoma Protein through the Recruitment of a Histone Methyltransferase. *Mol. Cell. Biol.* **21**(19), 6484-6494.
- Veraksa, A., Del Campo, M. and McGinnis, W. (2000);** Developmental patterning genes and their conserved functions: from model organisms to humans. *Mol Genet Metab* **69**(2), 85-100.

- Verona, R., Moberg, K., Estes, S., Starz, M., Vernon, J. P. and Lees, J. A.** (1997); E2F activity is regulated by cell cycle-dependent changes in subcellular localization. *Mol. Cell Biol.* **17**, 7268-7282.
- Vigo, E., Muller, H., Prosperini, E., Hateboer, G., Cartwright, P., Moroni, M. C. and Helin, K.** (1999); CDC25A phosphatase is a target of E2F and is required for efficient E2F- induced S phase. *Mol Cell Biol* **19**(9), 6379-95.
- Wang, A., Schneider-Broussard, R., Kumar, A. P., MacLeod, M. C. and Johnson, D. G.** (2000); Regulation of BRCA1 Expression by the Rb-E2F Pathway. *J. Biol. Chem.* **275**(6), 4532-4536.
- Wang, L., Brown, J. L., Cao, R., Zhang, Y., Kassis, J. A. and Jones, R. S.** (2004); Hierarchical recruitment of polycomb group silencing complexes. *Mol Cell* **14**(5), 637-46.
- Weinmann, A. S., Bartley, S. M., Zhang, T., Zhang, M. Q. and Farnham, P. J.** (2001); Use of chromatin immunoprecipitation to clone novel E2F target promoters. *Mol Cell Biol* **21**(20), 6820-32.
- Weinmann, A. S., Yan, P. S., Oberley, M. J., Huang, T. H. and Farnham, P. J.** (2002); Isolating human transcription factor targets by coupling chromatin immunoprecipitation and CpG island microarray analysis. *Genes Dev* **16**(2), 235-44.
- Weintraub, S. J., Prater, C. A. and Dean, D. C.** (1992); Retinoblastoma protein switches the E2F site from positive to negative element. *Nature* **358**(6383), 259-61.
- Wells, J., Boyd, K. E., Fry, C. J., Bartley, S. M. and Farnham, P. J.** (2000); Target gene specificity of E2F and pocket protein family members in living cells. *Mol Cell Biol* **20**(16), 5797-807.
- Whyte, P., Buchkovich, K. J., Horowitz, J. M., Friend, S. H., Raybuck, M., Weinberg, R. A. and Harlow, E.** (1988); Association between an oncogene and an anti-oncogene: the adenovirus E1A proteins bind to the retinoblastoma gene product. *Nature* **334**(6178), 124-9.
- Whyte, P., Williamson, N. M. and Harlow, E.** (1989); Cellular targets for transformation by the adenovirus E1A proteins. *Cell* **56**(1), 67-75.
- Wu, X. and Levine, A. J.** (1994); p53 and E2F-1 cooperate to mediate apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(9), 3602-6 Issn: 0027-8424.
- Wu, L., Timmers, C., Maiti, B., Saavedra, H. I., Sang, L., Chong, G. T., Nuckolls, F., Giangrande, P., Wright, F. A., Field, S. J., Greenberg, M. E., Orkin, S., Nevins, J. R., Robinson, M. L. and Leone, G.** (2001); The E2F1-3 transcription factors are essential for cellular proliferation. *Nature* **414**(6862), 457-62.
- Yamasaki, L., Jacks, T., Bromson, R., Goillot, E., Harlow, E. and Dyson, N. J.** (1996); Tumor induction and tissue atrophy in mice lacking E2F-1. *Cell* **85**, 537-548.

Yee, A. S., Reichel, R., Kovesdi, I. and Nevins, J. R. (1987); Promoter interaction of the E1A-inducible factor E2F and its potential role in the formation of a multi-component complex. *Embo J* **6**(7), 2061-8.

Zamanian, M. and La-Thangue, N. B. (1993); Transcriptional repression by the Rb-related protein p107. *Mol. Biol. Cell* **4**, 389-396.

Zhang, H. S., Gavin, M., Dahiya, A., Postigo, A. A., Ma, D., Luo, R. X., Harbour, J. W. and Dean, D. C. (2000); Exit from G1 and S phase of the cell cycle is regulated by repressor complexes containing HDAC-Rb-hSWI/SNF and Rb-hSWI/SNF. *Cell* **101**(1), 79-89.

Zhu, J. W., Field, S. J., Gore, L., Thompson, M., Yang, H., Fujiwara, Y., Cardiff, R. D., Greenberg, M., Orkin, S. H. and DeGregori, J. (2001); E2F1 and E2F2 determine thresholds for antigen-induced T-cell proliferation and suppress tumorigenesis. *Mol Cell Biol* **21**(24), 8547-64.

Diplomarbeiten

Rubeck, Andrea (2004); Identifizierung und Charakterisierung eines E2F6 regulatorischen Elementes in neuen E2F6 Zielgenen. *Philipps-Universität Marburg*

7 Zusammenfassung

E2F Transkriptionsfaktoren sind zentrale Regulatoren der Zellproliferation und der Zelldifferenzierung. E2F Proteine binden über eine konservierte DNA Bindedomäne an ein charakteristisches DNA Motiv der Sequenz (T(c/g)CCGC(c/g)). Dieses E2F Konsensusmotiv konnte in den Promotoren zahlreicher Gene nachgewiesen werden, darunter Gene für die Zellzyklusregulation, den Nukleotidstoffwechsel, die DNA Replikation, die Apoptose und die Zelldifferenzierung.

Der E2F Familie werden derzeit sieben Proteine zugeordnet (E2F1-E2F7). E2F1-E2F5 sind transkriptionelle Aktivatoren. Ihre transaktivierende Wirkung wird durch die zellzyklusabhängige Bindung an *Pocket* Proteine (pRb, p107, p130) negativ reguliert. E2F1-E2F5 zeigen eine sowohl spezifische als auch überlappende Funktionen in der Zellzyklusregulation und in der Embryonalentwicklung.

Dagegen bilden E2F6 und E2F7 transkriptionelle Repressoren, die nicht an *Pocket* Proteine binden. Ihre physiologische Funktionen sind unklar.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die *in-vivo* Funktion von E2F6 analysiert werden. Hierzu wurden E2F6 defiziente Mäuse charakterisiert, die in Vorarbeiten durch Dr. Stefan Gaubatz hergestellt und zur Verfügung gestellt wurden.

E2F6 defiziente Mäuse sind lebensfähig, gesund und fruchtbar. Somit scheint E2F6 nicht für die Embryonal- oder Postnatalentwicklung der Maus benötigt zu werden.

E2f6^{-/-} Fibroblasten proliferieren normal und zeigen eine zu den Kontrollzellen identische Zellzyklusverteilung. E2F6 defiziente Fibroblasten arretieren reversibel in der G0 Phase des Zellzyklus. Außerdem induzieren sie eine normale replikative und onkogene Seneszenz. Aus diesen Beobachtungen kann geschlossen werden, dass E2F6 nicht für die Zellzyklusregulation benötigt wird.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten zwei gewebespezifische Phänotypen E2F6 defizienter Mäuse beobachtet werden:

Zum einen wurde ein Defekt in der Spermatogenese E2F6 defizienter Männchen festgestellt, dessen molekulare Ursache jedoch unklar ist. Dieser Defekt beeinträchtigt nicht die Fruchtbarkeit von E2f6^{-/-} Mäusen.

Zum anderen konnten posteriore homeotische Transformationen entlang der antero-posterioren Achse von Skeletten E2F6 defizienter Mäuse identifiziert werden. Diese ähneln auffällig den Skelettphänotypen Polycomb Protein defizienter Mäuse. Da

vorangegangene Studien eine Interaktion von E2F6 mit Polycomb Proteinen zeigten, konnte durch den in dieser Arbeit beobachteten E2f6^{-/-} Phänotyp erstmals *in-vivo* Evidenz für eine funktionelle Interaktion von E2F6 mit Polycomb Proteinen erhalten werden.

Polycomb Proteine inhibieren die Expression von Hox Genen. Es kann daher spekuliert werden, dass E2F6 Polycomb Proteine an die Promotoren von Hox Genen rekrutiert. Im Gegensatz zu den Polycomb defizienten Mäusen konnte allerdings in ersten Untersuchungen keine deregulierte Expression spezifischer Hox Gene in 9.5 Tage alten E2f6^{-/-} Embryonen nachgewiesen werden. Daher wurde ein systematischer Ansatz gewählt, um E2F6 regulierte Gene zu identifizieren.

Unter Verwendung eines cDNA *Microarrays* konnten die meiotischen Kohäsine Smc112 (*Structural Maintenance of Chromosomes 112*) und Stag3 (*Stromal Antigen 3*), sowie das noch nicht charakterisierte Gen *XM_196054* als E2F6 regulierte Gene identifiziert und mit verschiedenen experimentellen Ansätzen bestätigt werden.

Durch den Nachweis von E2F6 auf dem endogenen Promotor von Stag3 kann eine direkte Regulation von Stag3 durch E2F6 angenommen werden. Weiterhin konnte eine E2F6 Konsensussequenz im Stag3 und Smc112 Promotor identifiziert werden, die eine Bindung von E2F6 ermöglicht und für eine Repression benötigt wird.

Anhand dieser Gene wurde in dieser Arbeit der E2F6 vermittelte Repressionsmechanismus untersucht: Dabei konnte beobachtet werden, dass Histon H3 des Smc112 und Stag3 Promotors in E2f6^{+/+}, nicht jedoch in E2f6^{-/-} Fibroblasten an H3 Lysin 9 (K9) dimethyliert und am Lysin 27 (K27) trimethyliert ist. Diese Methylierungen korrelieren mit der Repression der Stag3 und Smc112 Expression in E2f6^{+/+} Fibroblasten.

Zusätzlich konnte in E2F6^{-/-} Fibroblasten eine stärkere Acetylierung von Histon H3 am Stag3 Promotor im Vergleich zu E2f6^{+/+} Fibroblasten gezeigt werden. Diese Histonacetylierung korreliert mit einer Expression von Stag3 in E2F6 defizienten Zellen. In Einklang damit steht die Beobachtung, dass die stabile Repression von Smc112 und Stag3 die Aktivität von Histondeacetylasen benötigt. Außerdem wurde Evidenz für eine Funktion von DNA Methylierungen in der stabilen Smc112 und Stag3 Inhibition gewonnen.

Somit kann aus diesen Beobachtungen folgendes Modell einer E2F6 vermittelten Repression vorgeschlagen werden:

Durch die sequenzspezifische DNA Bindung von E2F6 werden Histondeacetylasen und/oder Histonmethyltransferasen an die Promotoren meiotischer Kohäsine rekrutiert. Der Nachweis des Polycomb Proteins RYBP auf dem Stag3 Promotor von E2f6^{+/+}

Fibroblasten zeigt, dass eine dauerhafte, stabile und vererbare Inhibition der Kohäsinexpression möglicherweise durch Polycomb Proteine vermittelt werden könnte.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine Funktion von E2F6 in der Inhibition zell- und differenzierungsspezifischer Gene identifiziert werden. Gleichzeitig wurde Evidenz für einen aktiven E2F6 Repressionsmechanismus erhalten, der durch Histonmodifikationen die Bindung von Polycomb Proteinen an E2F6 regulierte Promotoren ermöglicht.

8 Anhang

8.1 Abkürzungsverzeichnis

Sofern nicht hier aufgeführt, wurden Abkürzungen entsprechend den Maßangaben der IUPAC (*International union of pure and applied chemistry*) und denen des SI-Systems (*System Internationale de l'Unité*) verwendet. Spezielle Abkürzungen für Fachtermini, die nicht in dieser Liste enthalten sind, werden jeweils im Text erläutert.

A	Adenosin
AK	Antikörper
α -	anti-
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ARF	<i>alternative reading frame</i>
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
β -Gal.	β -Galaktosidase
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
ca.	circa
Cdc	cell division cycle
Cdk	cyclin dependent kinase
cDNA	copy DNA
CKI	cyclin dependent kinase inhibitor
CMV	Cytomegalovirus
Da	Dalton
dATP	2'-Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	2'-Desoxycytidintriphosphat
dGTP	2'-Desoxyguanosintriphosphat

dTTP	2'-Desoxythymidintriphosphat
DMEM	Dulbecco's modification of Eagle's minimal essential medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
dn	dominant negativ
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
DTT	Dithiothreitol
ECL TM	enhanced chemoluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorting</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i>
G	Guanosin
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HBS	Hepes-gepufferte Salzlösung
HEPES	N ₂ -Hydroxyethylpiperazin-N ₂ -Ethansulfonsäure
HLH	Helix-Loop-Helix-Domäne
HRP	<i>Horseradish-Peroxidase</i>
Ink4	<i>inhibitor of kinase 4</i>
IP	Immunpräzipitation
Kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
Ko	Kontrolle
l	Liter
LB	Luria-Bertani-Medium
Leu	Leuzin
LZ	Leuzin-Zipper
m	milli
M	molar
max	maximal
MEF	Maus embryonale Fibroblasten
min	Minute

M-MLV	<i>Moloney Murine Leukemia Virus</i>
Myc	Myelocytomatose Protein
mRNA	<i>messenger RNA</i>
μ	mikro
NIH	<i>National Institute of Health</i>
NLS	nuclear localisation signal
nm	Nanometer
NP40	Nonidet P-40
OD	optische Dichte
ONPG	o-Nitrophenyl-β-D-Galaktopyranosid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidendifluorid
Rb	Retinoblastom
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
RNAi	RNA-Interferenz
RNAse	Ribonuklease
rpm	<i>rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
RT	reverse Transkription
S	Serin
SDS	<i>sodiumdodecylphosphate</i>
ss	<i>single stranded</i>
SV40	Simian Virus
T	Threonin
T	Thymidin
TAE	Tris-Azetat/EDTA-Puffer
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TBS-T	Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween-20
TE	Tris/EDTA (Puffer)
TEMED	Tetramethylethyldiamin

TGF β	<i>Transforming growth factor β</i>
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
u.a.	unter anderem
UV	Ultraviolett
WB	<i>Western Blot</i>
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel
Zn	Zinkfinger

8.2 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Jörg Storre
Strasse: Chemin des Perrettes 19
Wohnort: 1024 Lausanne; Schweiz
Telefon: 0041 21 691 35 75
E-Mail: JStorre@web.de
Geburtsort und Datum: Oldenburg, den 02.04.1975

Schulische Ausbildung:

1988 – 1994 Gymnasium Lohne
Abschluss: Abitur

Wehrdienst

Oktober 1994 – September 1995

Akademische Ausbildung

Oktober 1995 – Februar 2001 Studium der Humanbiologie an der *Philipps-Universität Marburg*
Hauptfach: *Zellbiologie*
Nebenfächer: *Virologie und Immunologie*
Diplomarbeit am *Institut für Zytobiologie und Zytopathologie, Philipps-Universität Marburg* in der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Elsässer mit dem Titel: “Untersuchungen zur enzymatischen Aktivität des *“Lysosomal Apyrase like Protein 70“ (Lalp70)*”

Abschluss: *Diplom Humanbiologie*

ab April 2001 Promotion am *Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung, Philipps-Universität Marburg*
Arbeitsgruppe Dr. Stefan Gaubatz
Abteilung Prof. Martin Eilers

8.3 Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer an der Philipps-Universität in Marburg waren die Damen und Herren:

Aumüller, Aurich, Barth, Beato, Eilers, Elsässer, Feuser, Fruhstorfer, Garten, Gemsa, Grzeschik, Habermehl, Hartmann, Hasilik, Hensel, Jungclas, Kadenbach, Kern, Kirchner, Klenk, Knöller, Koch, Koolman, Lang, Lill, Löffler, Lührmann, Meinhardt, McGregor, Melsheimer, Müller R., Radsak, Riesau, Röhm, Rogausch, Schachtschabel, Schäfer, Schulz, Seifart, Seitz J., Seitz K.A., Steininger, Steinmetz, Suske, Voigt, von Löw, Waßmuth, Weseman, Westermann, Westphal.

8.4 Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg eingereichte Arbeit mit dem Titel

Untersuchungen zur biologischen Funktion des transkriptionellen Repressors E2F6

am Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung der Philipps-Universität Marburg unter der Leitung von Dr. Stefan Gaubatz in Kollaboration mit Prof. Dr. Martin Eilers ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem anderen in- und ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Ein Teil der vorliegenden Arbeit wurde in folgendem Publikationsorgan veröffentlicht:

Storre, J.,Elsaesser, H.-P.,Fuchs, M.,Ullmann, D.,Livingston, D. M. and Gaubatz, S. (2002); Homeotic transformations of the axial skeleton that accompany a targeted deletion of E2F6. *EMBO Rep* **3**(7), 695-700.

Lausanne, den

(Jörg Storre)

Danksagung

Zum Schluss sei all denen gedankt, die mich bei der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt, gefördert, beraten und begleitet haben. Sie alle haben jeder auf seine Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen:

Dr. Stefan Gaubatz, unter dessen wissenschaftlicher Anleitung diese Arbeit entstanden ist. Er wusste meine Arbeit anzuleiten, ohne einzuschränken. Seine Begeisterung für wissenschaftliche Fragestellungen war ansteckend und motivierend. Durch seine Anleitung habe ich gelernt, meine Arbeit kritisch zu hinterfragen, die richtigen Folgerungen zu ziehen und diese schlüssig zu diskutieren.

Prof. Dr. Martin Eilers für die Begleitung dieser Arbeit, produktive und kritische Ratschläge und für sein Interesse am Verlauf des E2F6 Projektes.

Diana Ullmann und Martina Seitz für ihre vorbildliche Unterstützung in der Organisation des Laboralltags, in der Bewältigung der Mausezucht und für eine hervorragende technische „Beratung“, wenn nichts mehr gelingen wollte.

Andrea Rubeck im Speziellen für eine tolle Zusammenarbeit und für die wichtige Erfahrung, mit guter Koordination ein Projekt zügig voranbringen zu können.

Franziska Koch, Katrin Killmer und Christine Neuhaus, meinen „Praktikanten“, die mir alle sehr geholfen haben, und denen allen für Ihre Geduld mit mir als ihren „Betreuer“ gedankt sei.

Yvonne, Sladjana, Stephan, Amelie, Lisa, Denise und Björn für die produktive und unkomplizierte Zusammenarbeit, den regen wissenschaftlichen und den ebenso wichtigen weniger wissenschaftlichen Austausch. Sie alle haben zu einer angenehmen Arbeitsatmosphäre beigetragen.

Steffi Hauser sei im Speziellen für das (wirklich) kritische Hinterfragen meiner Arbeit gedankt, für die vielen Stunden, die sie Probevorträge ertragen musste und für die Korrekturen meiner englischen Aussprache!

Markus - Kalle - Klödi - Kleinschmidt für die wissenschaftlichen Diskussionen, sein immer offenes Ohr für Sorgen und Nöte eines zum Schluss zur Panik neigenden Schicksalsgenossen und seine enorme Antrittstärke am Berg!

Imme Krüger für ihr Interesse an meiner Arbeit und ihre enorme Hilfsbereitschaft.

Dr. Michael Krause für die geduldige technische Unterstützung bei meinem Einstieg in die Welt der Microarrays.

„Pi“ Elsässer und Waltraut Ackermann, die viel Zeit und Aufwand für histologische Analysen auf sich genommen haben - lieben Dank dafür.

José Barbero für die unkomplizierte Zusammenarbeit, T. Jenuwein, M. Vidal, und M. v. Lohuizen für die Bereitstellung von Antiseren.

Meinen Freunden für das Anteilnehmende Interesse und Verständnis.

Meiner Familie, die mich durch alle Höhen und Tiefen begleitet hat, an mich geglaubt hat, mir, ohne „von Fach“ zu sein, durch Rat und geduldiges Zuhören vieles erleichtert hat und dadurch so manche Sorge zu lindern wusste.

Ein besonderer und tiefer Dank an Steffi Driess, für ihre unendliche Geduld, für ihre rührende und bedeutende Unterstützung und Ihre Gabe mir eine kritische Distanz zu meinem Tun zu bewahren.